UNTERSUCHUNGEN ZUM ACETATSTOFFWECHSEL IN RHODOPSEUDOMONAS GELATINOSA UND ANDEREN RHODOSPIRILLACEAE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Heidrun Albers
aus Göttingen

Göttingen 1975

UNTERSUCHUNGEN ZUM ACETATSTOFFWECHSEL IN RHODOPSEUDOMONAS GELATINOSA UND ANDEREN RHODOSPIRILLACEAE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Heidrun Albers
aus Göttingen

Göttingen 1975

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie
der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk
Korreferent: Prof. Dr. H. G. Schlegel
Tag der mündlichen Prüfung: 29. 4. 1975

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	3
C. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	39
I. Wachstumsphysiologische Untersuchungen	39
1. Wachstum auf Citrat, Malat und Acetat	39
II. Nachweis der Malyl-CoA-Lyase und der Enzyme des Glyoxylatzyklus in zellfreien Extrakten	42
1. Bestimmung der Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase-Aktivität in R. gelatinosa nach Wachstum auf Acetat	42
2. Einfluß verschiedener Substrate auf die Enzyme des Glyoxylatzyklus in R. gelatinosa	44
a) Isocitrat-Lyase	44
b) Malat-Synthase	48
3. Versuche zum Nachweis der Malyl-CoA-Lyase in R. gelatinosa	50
4. Nachweis von Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase in verschiedenen Rhodospirillaceae nach Wachstum auf Acetat	51
5. Einfluß von DTNB auf die Aktivität der Malat-Synthase der Rhodospirillaceae	55
6. Verbreitung der Malyl-CoA-Lyase in den Rhodospirillaceae	57
III. Versuche zum Nachweis der Reaktionen, die in R. gelatinosa Glyoxylat weiter umsetzen	59
1. Versuche zum Nachweis des Glycerat-Wegs	59
2. Versuche zum Nachweis des ß-Hydroxyaspartat-Wegs	62

Seite

3. Beteiligung einer Transaminierungsreaktion an der weiteren Umsetzung des Glyoxylats 68

4. Beteiligung einer Transaminierungsreaktion am Acetatstoffwechsel in anderen Rhodospirillaceae 72

5. Beteiligung des Serin-Wegs an der Umsetzung des Glycins in R. gelatinosa 73

5.1. Nachweis der Transhydroxymethylase 75

5.2. Nachweis der Hydroxypyruvat-Reduktase 77

5.3. Nachweis der Serin-Glyoxylat-Reduktase 79

5.4. Nachweis der Glycerat-Kinase 82

6. Umsetzung des Serins zum Pyruvat mit Hilfe der Serin-Dehydratase 85

7. Nachweis der verbindenden Reaktionen zwischen dem Serin-Weg und dem TCC 85

8. Verhalten der Enzyme des Glyoxylatzyklus, des Serin-Wegs sowie der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase beim Wechsel der Wachstumsbedingungen 87

9. Versuche zum Nachweis der Pyruvat-Synthase 90

IV. Versuche zum Abbau des Acetats bei Rhodospirillum rubrum 92

D. DISKUSSION 96

E. ZUSAMMENFASSUNG 105

F. LITERATURVERZEICHNIS 106

Abkürzungen

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Acetat-Kinase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute
DH	Dehydrogenase
DTNB	5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
E	Enzymeinheit
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
$Fd(H_2)$	(reduziertes) Ferredoxin
GDP	Guanosindiphosphat
ICL	Isocitrat-Lyase
KPO_4	Mischung aus K_2HPO_4 und KH_2PO_4
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
MET	Mercaptoäthanol
MS	Malat-Synthase
NAD(P)	Nicotin-adenin-dinucleotid(phosphat)
$NAD(P)H_2$	reduziertes Nicotin-adenin-dinucleotid(phosphat)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat-Kinase
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-di-2-(4-methyl-5-phenoxaolyl)-benzol
PTA	Phosphotransacetylase
R.	Rhodopseudomonas
Rsp.	Rhodospirillum
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triäthanolamin

THF	Tetrahydrofolsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TPP	Thiaminpyrophosphat
U	Umdrehungen/min

A. EINLEITUNG

Rhodopseudomonas gelatinosa ist unter den phototrophen Bakterien dadurch ausgezeichnet, daß er unter anaeroben Bedingungen im Licht sehr gut auf Citrat wachsen kann (KLEMME, 1968; BIEBL, 1967). Bei der Untersuchung der Citratverwertung stellten SCHAAB et al. (1972) fest, daß dieses Substrat sehr schnell in Acetat und Oxalacetat gespalten wird und daß dabei große Mengen von Acetat ausgeschieden werden. Nach dem Verbrauch des Citrats wächst der Organismus auf dem Acetat weiter. In der Phase des Übergangs des Wachstums von Citrat auf Acetat wird das citratspaltende Enzym, die Citrat-Lyase, inaktiviert (GIFFHORN et al., 1972).

Diese Ergebnisse gaben den Anlaß, den Acetatstoffwechsel bei R. gelatinosa zu untersuchen. Die Oxydation des Acetats erfolgt bei den phototrophen Bakterien über den Tricarbonsäurezyklus (GLOVER et al., 1952; EISENBERG, 1953; ELSDEN und ORMEROD, 1956). Die Synthese von Zellmaterial erfordert deshalb eine Reaktion oder eine Reaktionsfolge, durch die die Verbindungen, die für die Zellsynthese dem TCC entzogen werden, nachgeliefert werden (anaplerotische Sequenz). Als anaplerotische Sequenz wurde von KORNBERG und KREBS (1957) für E. coli und eine Reihe weiterer Bakterien der Glyoxylatzyklus beschrieben. An diesem Zyklus sind die Isocitrat-Lyase (SMITH und GUNSALUS, 1954, 1955, 1957; OLSON, 1954; SAZ und HILLARY, 1956) und die Malat-Synthase (WONG und AJL, 1956) beteiligt.

Es sollte untersucht werden, ob R. gelatinosa über die Enzyme des Glyoxylatzyklus verfügt. Vergleichende Untersuchungen sollten an weiteren Rhodospirillaceae vorgenommen werden.

Eine andere anaplerotische Sequenz scheint in Rhodospirillum rubrum und Chlorobium thiosulfatophilum bei Wachstum auf Acetat vorhanden zu sein (BUCHANAN et al., 1964, 1967; EVANS und BUCHANAN, 1965). Diesen

Bakterien ist die reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat möglich. Die Reaktion wird von der Pyruvat-Synthase katalysiert, die hauptsächlich in strikt anaeroben Bakterien wie den Clostridien und Sulfat-reduzierenden Bakterien vorkommt (TOMLINSON, 1954 a, b; ANDREW und MORRIS, 1965). Um eine Beteiligung der Pyruvat-Synthase an der Bildung von C_4-Dicarbonsäuren aus Acetat auch bei R. gelatinosa nachzuweisen bzw. auszuschließen, wurden die nötigen enzymatischen Experimente durchgeführt.

Der Verlauf der Untersuchungen machte es notwendig, zusätzlich auf den Glyoxylat- und Glycinstoffwechsel einzugehen. Die dabei unternommenen Untersuchungen führten zum Nachweis von Reaktionen, die für das Wachstum von R. gelatinosa von Bedeutung sind.

Weiterhin wurde untersucht, ob die bei R. gelatinosa gefundenen Ergebnisse auf andere Rhodospirillaceae übertragbar waren. Dabei zeigte sich, daß innerhalb dieser Bakterien offensichtlich verschiedene anaplerotische Sequenzen benutzt werden, um, während des Wachstums auf Acetat, Intermediäre des Tricarbonsäurezyklus nachzubilden.

B. METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen wurden an folgenden Organismen durchgeführt:

Rhodopseudomonas gelatinosa	St. 2150	DSM 149	
Rhodopseudomonas capsulata	St. Kb 1	DSM 155	
Rhodopseudomonas palustris		DSM 124	ATCC 17 002
Rhodopseudomonas sphaeroides		DSM 158	ATCC 17 023
Rhodomicrobium vannielii	St. 7256	DSM 166	
Rhodospirillum fulvum	St. 1360	DSM 113	
Rhodospirillum rubrum	St. Ha	DSM 107	
Rhodospirillum tenue	St. 2761	DSM 109	
Rhodospirillum tenue	St. 3761	DSM 111	
Rhodopseudomonas viridis	St. 2750	DSM 135	
Rhodopseudomonas viridis	St. R. v. F	DSM 133	ATCC 19 567
Rhodospirillum molischianum	St. NTHC 131	DSM 120	
Escherichia coli	St. K 12	DSM 498	ATCC 23 716
Paracoccus denitrificans	St. Morris	DSM 413	IMG 1628

Die phototrophen Organismen wurden von Herrn Prof. Dr. N. Pfennig, Göttingen, zur Verfügung gestellt. Escherichia coli und Paracoccus denitrificans stammten aus der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen).

2. Nährlösungen und Anzucht der Zellen

a) Zusammensetzung der Nährlösung für phototrophe Bakterien (Grundmedium) (nach PFENNIG, 1969)

KH_2PO_4	1,00 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,40 g

$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,05 g
NH_4Cl	0,40 g
NaCl	0,40 g
Hefeextrakt	0,20 g
Spurenelementlösung (SL 4) (10fach konzentriert)	1,00 ml
Entionisiertes Wasser	ad 1,00 Liter

Die Lösung wurde auf pH 6,7 eingestellt.

Bei Rhodospirillum molischianum und Rhodospirillum fulvum wurden zu 100 ml Nährlösung 1 ml einer 5 %igen Ascorbinsäure-Lösung hinzugefügt, die vorher sterilfiltriert worden war.

Bei den meisten Versuchen wurden zu dem Grundmedium 20 mM Acetat hinzugefügt. Allerdings wurden auch andere C-Quellen benutzt. Die Mengenangaben sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tab. 1 Substrat-Konzentrationen für die Anzucht phototropher Bakterien

Kohlenstoffquelle	g/Liter	mM
Na-Acetat	1,64	20
Na-L-Malat	0,67	5
Na-Succinat	0,81	5
Na-Glycolat	2,8	29
Na-Formiat	1,36	20
Na-Citrat	2,00	6,8
Glycin	1,00	13,2

Zusammensetzung der Spurenelementlösung (SL 4) (PFENNIG und LIPPERT, 1966)

Einfach-konzentriert	
Destilliertes Wasser	1 000 ml
Äthylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)	500 mg
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	200 mg
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	10 mg
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	3 mg
H_3BO_3	30 mg
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	20 mg
$CuCl_2 \cdot 6 H_2O$	1 mg
$NiCl_2 \cdot 6 H_2O$	2 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	3 mg

Die Lösung hatte nach Zugabe aller Bestandteile einen pH von 3 - 4.

Anwendung: 10 ml der einfach konzentrierten Lösung
auf 1 Liter Nährmedium

b) Anzucht von phototrophen Bakterien

Die Zellen wurden in Schraubdeckelflaschen verschiedener Volumina anaerob bei einer Lichtintensität von 1 500 - 3 000 Lux angezogen. Es wurde etwa 10 %ig angeimpft.

Große Zellanzuchten wurden in 5 l- oder 10 l-Flaschen auf einem Magnetrührwerk durchgeführt. Sie wurden mit einer PHILIPS-Compialux-Flood-Glühlampe (100 Watt) beleuchtet. Die Flaschen waren bis zum Hals gefüllt und wurden mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. In die Durchbohrungen des Gummistopfens wurden zwei Glasrohre eingeführt. Das eine Rohr diente zur Begasung, das andere war mit dem Probennehmer verbunden. Die Proben wurden mit Hilfe von Überdruck entnommen.

Wenn der aerobe Dunkelstoffwechsel untersucht werden sollte, wurden die Kulturen in Erlenmeyer-Kolben angezogen. Die Kolben waren nur 10 %ig mit Nährlösung gefüllt und wurden mit Alufolie umwickelt, sodaß sie gegen Lichteinfall geschützt waren. Die Inkubationstemperatur betrug 27° C.

c) Durchführung der Wachstumsversuche

Bei den Wachstumsversuchen in 5 l-Jenaer Glasflaschen wurden mit Stickstoff Proben aus dem Kulturgefäß gedrückt. Von den entnommenen Proben wurden die Trübung und der pH bestimmt. Anschließend wurden die Zellen der Probe abzentrifugiert und das Pellet für die Enzymtests bei -20° C eingefroren.

Die Wachstumsversuche, bei denen ein Wechsel der Wachstumsbedingungen von dunkel-aerob nach hell-anaerob vorgenommen werden mußte, wurden folgendermaßen durchgeführt: Zehn 100 ml Erlenmeyer-Kolben, die 10 ml Nährlösung enthielten, wurden 10 %ig beimpft. Nach etwa 3 Tagen wurden mit diesen Kulturen zehn 1 l Erlenmeyer-Kolben, die 100 ml Nährlösung enthielten, angeimpft. Nach weiteren 3 Tagen wurden hiermit zehn 2 l Kolben angeimpft, die 800 ml Nährlösung enthielten. Durch diese 3 Passagen sollte gewährleistet sein, daß die Zellen mit Sicherheit an aerobe Verhältnisse adaptiert waren. Danach wurde der Inhalt der zehn 2 l Kolben in eine 10 l-Jenaer-Glasflasche überführt, aus der dann die Proben auf oben beschriebene Weise entnommen wurden.

d) Test auf Reinheit der phototrophen Bakterien

Alle bearbeiteten phototrophen Stämme wurden im AC-Medium mit 0,5 % Agar auf Reinheit überprüft. Das AC-Medium eignete sich für diese Untersuchungen sehr gut, da sowohl aerobe als auch anaerobe Bakterien in die-

sem Medium erfaßt wurden (DIFCO Manual, 1953).

Außerdem wurden die Kulturen laufend auf 5 mM Succinatmedium ausgestrichen und auf gleichartige Kolonieformen (Farbe und Form) untersucht. Zusätzlich wurden noch mikroskopische Reinheitskontrollen durchgeführt.

Für die Organismen R. capsulata und R. sphaeroides wurde nach VAN NIEL (1944) eine zusätzliche Reinheitskontrolle durchgeführt, um mit Sicherheit zwischen diesen beiden Organismen unterscheiden zu können.

Folgende Nährmedien wurden angesetzt:

Grundmedium mit 0,02 % Hefeextrakt	+ 0,1 % Äthanol
"	+ 0,1 % Glycerin
"	+ 0,1 % Mannit
"	+ 0,1 % Sorbit
"	+ 0,1 % Mannose
"	+ 0,1 % Gluconat

Im Gegensatz zu R. sphaeroides kann R. capsulata obige C-Quellen nicht verwerten.

e) Nährlösung für Escherichia coli (KRAKOW et al., 1961)

$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g
Na_2HPO_4	6,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g
NaCl	0,5 g
Na-Glycolat	2,8 g
Dest. Wasser	ad 1 000 ml

Die Lösung wurde vor dem Sterilisieren auf pH 7,0 eingestellt. Die Zellen wurden bei 27° C geschüttelt.

f) Nährlösung für Paracoccus denitrificans (KORNBERG und MORRIS, 1962)

K_2HPO_4	6,0	g
KH_2PO_4	4,0	g
NH_4Cl	3,2	g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2	g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,04	g
$MnSO_4$	0,008	g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,005	g
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,015	g
Na-Glycolat	2,5	g
Dest. Wasser	ad 1 000	ml

Die Zellen wurden in einem 1 l-Rundkolben belüftet und bei 37° C inkubiert.

3. Messung der Zelldichte

Die Zelltrübung wurde bei einer Wellenlänge von 650 nm in Glasküvetten von 1 cm Schichtdicke in einem Zeiss PM 4 Photometer gegen Nährlösung gemessen. Dicke Suspensionen wurden mit Nährlösung so verdünnt, daß die Extinktion nicht größer als 0,3 war.

4. Herstellung des zellfreien Extrakts

1 g bei -20° C eingefrorene Zellen wurden in 8 ml 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2 aufgenommen und gut homogenisiert. Bei Enzymen, die sauerstoffempfindlich waren, wurden 0,04 ml 1 M Mercaptoäthanol hinzugefügt. Diese Suspension wurde entweder mit Ultraschall oder mit der French-Presse behandelt.

Bei Ultraschallbehandlung (Gerät: MSE Ultrasonic Desintegrator 100 W Modell cat: No. 7 100) beschallte man die Zellen 5 - 7 min in mehreren Intervallen. Gekühlt wurde mit dem Tra-Kryomaten TK 30 D (Meßgerätewerk Lauda) bei -10° C. Es konnte so darauf geachtet werden, daß die Suspension die Temperatur von 8° C nicht überschritt. Anschließend wurde bei 15 000 U 30 min bei 0° - 4° C in der Sorvall Superspeed abzentrifugiert.

Der Überstand wurde entweder direkt für die Enzymtests verwendet oder bei 100 000 g für eine Stunde abzentrifugiert, wenn es wichtig war, den Extrakt möglichst von NADH-Oxidase und (oder) von Pigmenten zu befreien.

Um die Zellen mit der French-Presse aufzuschließen, wurde die Presse (Amicon French-Press, Lot. No. 16 806, Cat. No. 4-3396, Silver Spring, Maryland) im Kühlschrank auf 4° C vorgekühlt. Dann wurde die Suspension zweimal mit einem Druck von 8 t/cm^2 langsam durch die Öffnung gedrückt. Der so entstandene Extrakt wurde dann weiterbehandelt wie nach dem Ultraschallaufschluß. Ein Unterschied in den Enzymaktivitäten nach Ultraschall- oder French-Press-Behandlung konnte nicht festgestellt werden.

5. Proteinbestimmung

a) an zellfreien Extrakten (BEISENHERZ et al., 1953)

Bei phototrophen Organismen wurden 0,1 ml Extrakt mit 4 ml Aceton versetzt um die Zellpigmente zu entfernen. Man ließ das Aceton 20 min einwirken. Anschließend wurde 5 min bei 4 000 U in einer Christ-Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Dann wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

20 % KOH	0,5 ml
dest. Wasser	4,5 ml
Biuret-Reagenz	5,0 ml

Dies wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann in einer 2 cm Küvette bei 546 nm im Zeiss Photometer PM 4 gegen 0,5 ml 20 % KOH, 4,5 ml dest. Wasser und 5,0 ml Biuret-Reagenz gemessen. Eine Eichkurve war mit Rinderserumalbumin hergestellt worden. Als Umrechnungsfaktor zur Proteinbestimmung wurde ein Faktor von 21,0 ermittelt.

$$OD_{2\ cm}\ 546 \times 21{,}0 = \text{mg Protein/Test}$$

b) an ganzen Zellen

10 ml Zellsuspension wurden 20 min in der Christ-Tischzentrifuge bei 4 000 U abzentrifugiert. Zu dem Pellet wurden 4 ml Aceton gegeben, das man 20 min einwirken ließ, um die Pigmente zu extrahieren. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 4 000 U wurden zu dem Pellet 0,5 ml 20 % KOH und 4,5 ml dest. Wasser gegeben. Dies wurde 5 min gekocht, um die Zellen aufzulösen. Nach erfolgter sofortiger Abkühlung im kalten Wasser wurden 5,0 ml Biuret-Reagenz hinzugegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 546 nm gegen den Reagenzienleerwert.

c) BIURET-Reagenz

0,2 N NaOH	400 ml
KNa-Tartrat	9 g
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ (pulverisiert)	3 g
KJ	5 g
0,2 N NaOH	ad 1 000 ml

Die Lösung wurde in einer dunklen Flasche mit Gummistöpsel verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt.

6. Bestimmung der Enzymeinheiten

Die spezifische Aktivität wurde für jedes Enzym in dem Bereich linearer Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Extraktmenge ermittelt und in Einheiten (E) pro g Protein angegeben. Eine Einheit bedeutete die Umsetzung von 1 µMol Substrat pro Minute. Bei allen Tests wurden Kontrollen ohne Substrat durchgeführt.

7. Radioaktive Messungen

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Scintillations Spectrometer (Tri-Carb, Modell 3375, Firma Packard, Frankfurt/M.). Die Radioaktivität der ^{14}C-Verbindungen in wässriger oder organischer Lösung wurde in der von BRAY (1960) angegebenen Scintillationsflüssigkeit bestimmt.

a) Scintillationsflüssigkeit (BRAY, 1960)

Naphthalin	60	g
PPO	4	g
Dimethyl-POPOP	0,2	g
Methanol	100	ml
Äthylenglycol	20	ml
Dioxan	850	ml

b) Pyruvat-CO_2-Austauschreaktion (ANDREESEN et al., 1974)

Hauptraum:	0,5 M	KPO_4-Puffer, pH 7,2	0,20 ml
	1,0 M	Mercaptoäthanol	0,05 ml
	1,0 M	Na-Pyruvat	0,10 ml
	0,2 M	$MnSO_4$	0,01 ml
	0,02 M	Thyaminpyrophosphat (TPP)	0,05 ml
	0,001 M	CoA	0,05 ml

	Extrakt	0,25 - 0,50 ml
	dest. Wasser	0,79 - 0,54 ml
Seitenarm 1		
	Gemisch aus 2 ml $KHCO_3$ + 0,02 ml $NaH^{14}CO_3$ + 17,98 ml dest. Wasser = 300 640 cpm/ 10 µMol	0,10 ml
Seitenarm 2		
	20 % $HCLO_4$	0,20 ml

Bemerkung: Bei R. gelatinosa brauchte in Veränderung der Originalvorschrift kein Avidin (50 µg) hinzugegeben werden, da bei R. gelatinosa keine Pyruvat-Carboxylase vorhanden ist, die durch Avidin gehemmt werden kann.

Das Prinzip der Messung beruhte darauf, daß bei dieser Austauschreaktion $^{14}CO_2$ in Pyruvat eingebaut wurde. Das markierte Pyruvat konnte man als nicht-flüchtige Substanz messen. Der Versuch wurde im Warburg bei 30° C durchgeführt. Man durchströmte die Gefäße 10 min mit sauerstofffreiem Stickstoff und schloß dann die Hähne. Dann wurde das $KHCO_3/NaH^{14}CO_3$-Gemisch gekippt. Man ließ die Reaktion 30 oder 60 min laufen und stoppte dann mit Perchlorsäure ab. Das ausgefällte Protein wurde durch Zentrifugieren bei 4 000 U entfernt. Den Überstand durchblies man ca. 5 min mit Luft, um das nicht fixierte $^{14}CO_2$ zu entfernen. Die Zeit mußte dabei genau eingehalten werden, da beim Durchblasen Flüssigkeit verdunstete. Dadurch würde eine zu hohe nicht-flüchtige Radioaktivität vorgetäuscht. Nachdem das $^{14}CO_2$ entfernt war, entnahm man 0,5 ml Proben und zählte das radioaktiv markierte ^{14}C-Pyruvat im Tri-Carb aus.

c) Serin-Transhydroxymethylase (EC 2.1.2.1) (TAYLOR und WEISSBACH, 1965)

5 mM	Serin	0,02 ml
	3-^{14}C-Serin (164 000/0,1 µMol Serin)	0,02 ml
1 mM	Pyridoxalphosphat	0,1 ml
8 mM	THF	0,013 ml
100 mM	Mercaptoäthanol	0,04 ml
0,5 M	KPO_4-Puffer, pH 7,4	0,06 ml
	Extrakt	0,02 - 0,1 ml
	dest. Wasser	ad 0,4 ml

Der Ansatz wurde 5 - 15 min bei 37° C inkubiert. Danach wurden hinzugefügt:

1,0 M	Na-Acetatpuffer, pH 4,7	0,3 ml
0,1 M	Formaldehyd	0,2 ml
0,4 M	Dimedon	0,3 ml

Die Reaktion wurde mit dem Na-Acetatpuffer gestoppt.

Nachdem Formaldehyd und Dimedon hinzugefügt worden waren, wurden die Testansätze 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt, um die Bildung von Formaldehyd-Dimedonderivaten zu beschleunigen. Es folgte ein 5-minütiges Abkühlen der Röhrchen in einem Eisbad. Dann wurde die Dimedonkomponente durch heftiges Schütteln mit 5 ml Toluol extrahiert. Die dabei entstehenden zwei Phasen wurden sauber durch 2-minütiges Zentrifugieren getrennt.

3 ml der oberen Phase wurden in 5 ml BRAY'sche Lösung überführt und im Tri-Carb ausgezählt.

8. Photometrische Messungen

Photometrische Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in einem Zeiss Photometer PM 4 vorgenommen. Das Photometer war über einen TE-Wandler (Firma Carl Zeiss) mit einem SERVOGOR-Schreiber verbunden, der die Extinktionsveränderung aufzeichnete.

Für die Tests wurden Glasküvetten mit 1 cm Schichtdicke benutzt. Wenn Quarzküvetten mit 2 cm Schichtdicke benutzt wurden, ist dies bei dem betreffenden Test erwähnt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Tests bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Enzyme des Glyoxylatzyklus

8.1.a. Isocitrat-Lyase (EC 4.1.3.1) (DIXON und KORNBERG, 1959)

0,1 M	KPO_4-Puffer, pH 7,2	2,0 ml
0,1 M	$MgCl_2$	0,15 ml
0,1 M	Phenylhydrazin (frisch angesetzt)	0,1 ml
0,06 M	Cystein-HCl (frisch angesetzt u. neutralisiert)	0,1 ml
0,1 M	Na-Isocitrat	0,1 ml
	Extrakt	0,1 ml
	dest. Wasser	ad 3,0 ml

Die Reaktion wurde im allgemeinen mit Na-Isocitrat gestartet und die Bildung des Glyoxylsäurephenylhydrazons bei 324 nm verfolgt. Die Reaktion hatte eine lag-Phase von ungefähr 1 min.

Der molare Extinktionskoeffizient betrug: $1,7 \cdot 10^4$. Im allgemeinen wurde das Enzym nach dieser Testmethode untersucht; wenn die folgenden Testbedingungen gewählt wurden, ist es im Text besonders erwähnt.

8.1.b. Isocitrat-Lyase (EC 4.1.3.1)

0,10 M	KPO_4-Puffer, pH 7,2	2,00 ml
0,10 M	$MgCl_2$	0,15 ml
0,06 M	Cystein-HCl (frisch angesetzt u. neutralisiert)	0,10 ml
	LDH (1 mg/ml)	0,01 ml
0,01 M	$NADH_2$	0,03 ml
	Extrakt	0,30 ml
0,10 M	Na-Isocitrat	0,10 ml
	dest. Wasser	ad 3,00 ml

Das Prinzip der Messung beruhte darauf, daß LDH auch Glyoxylat umsetzt. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

8.2.a. Malat-Synthase (EC 4.1.3.2) (SRERE et al., 1963)

0,1 M	Tris-HCl, pH 8,4	0,50 ml
0,1 M	$MgCl_2$	0,05 ml
10 mM	Acetyl-CoA	0,02 ml
10 mM	Glyoxylat (frisch angesetzt u. neutralisiert)	0,20 ml
1 mM	DTNB (in 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2)	0,10 ml
	Extrakt	0,01 - 0,1 ml
	dest. Wasser	ad 1,00 ml

Diese Methode eignete sich bei R. gelatinosa und R. palustris für einen diskontinuierlichen Test, da die Malat-Synthase dieser beiden Organismen durch DTNB quantitativ gehemmt wurde.

Dazu waren pro Extraktkonzentration zwei Ansätze notwendig:

a) Man ließ den vollständigen Ansatz 2 min reagieren und stoppte mit DTNB ab. Die dabei erreichte Extinktion wurde bei 412 nm gemessen.

b) Man ließ einen Ansatz mit derselben Extraktkonzentration ohne Glyoxylat ebenfalls 2 min reagieren und stoppte wieder mit DTNB ab. Es wurde die erreichte Extinktion bei 412 nm abgelesen. Dieser Wert gab die Aktivität der Acetyl-CoA-Deacylase wieder und mußte von dem Wert des vollständigen Ansatzes abgezogen werden.

Die anderen phototrophen Organismen konnten kontinuierlich in Anwesenheit von DTNB gemessen werden. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt: $14{,}14 \cdot 10^3$ (COLLIER, 1973).

8.2.b. Malat-Synthase (EC 4.1.3.2) (DIXON und KORNBERG, 1959)

0,10 M	Tris-HCl, pH 8,4	0,50 ml
0,10 M	$MgCl_2$	0,05 ml
0,01 M	Acetyl-CoA	0,02 ml
0,01 M	Glyoxylat (frisch angesetzt u. neutralisiert)	0,20 ml
	Extrakt	0,02 - 0,04 ml
	dest. Wasser	ad 1,00 ml

Das Prinzip dieser Messung beruhte auf der abnehmenden optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 232 nm als Folge der Spaltung der Acetyl-CoA-Thioesterbindung in Gegenwart von Glyoxylat.

Die Messung erfolgte in einem Zeiss Photometer, Modell PMQ II, bei 232 nm in einer Quarzküvette. Der molare Extinktionskoeffizient beträgt: $5{,}4 \cdot 10^3$.

8.2.c. Herstellung von Acetyl-CoA (SIMON und SHEMIN, 1953)

10 mg CoA-Lithiumsalz wurden in 1 ml dest. Wasser gelöst. Dazu wurden 0,1 ml 1 M $KHCO_3$ gegeben. Unter Schütteln wurden 0,2 ml Essigsäureanhydrid in 10 ml kaltes Wasser hinzugefügt. Von dieser Lösung wurden schnell 0,2 ml zu der CoA-Lösung gegeben und gut gemischt.

8.3. NAD oder NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.41 oder EC 1.1.1.42) unter Testbedingungen der Isocitrat-Lyase

0,10 M	KPO_4-Puffer, pH 7,2	2,00 ml
0,10 M	$MgCl_2$	0,15 ml
0,06 M	Cystein-HCl (neutralisiert)	0,10 ml
0,01 M	NAD oder NADP	0,03 ml
0,10 M	Na-Isocitrat	0,10 ml
	dest. Wasser	ad 3,00 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Enzyme des ß-Hydroxyaspartat-Weges

8.4. ß-Hydroxyaspartat-Aldolase (GIBBS und MORRIS, 1964)

0,10 M	Tris-HCl, pH 8,0	0,1 ml
0,01 M	Pyridoxalphosphat	0,01 ml
0,10 M	$MgCl_2$	0,005 ml
0,01 M	$NAD(P)H_2$	0,012 ml
	Extrakt	0,01 - 0,02 ml
	dest. Wasser	ad 1,00 ml

Zu diesen 1,00 ml wurden hinzugefügt:

0,01 M	Glyoxylat (frisch neutralisiert)	0,1 ml
0,10 M	Glycin	0,05 ml

Das gebildete ß-Hydroxyaspartat wurde mit einem Überschuß an ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase und MDH zu Oxalacetat und Malat umgesetzt. Diese Umsetzung von Oxalacetat zu Malat konnte bei 340 nm verfolgt werden.

8.5. ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase (EC 4.2.1.13 - EC 4.2.1.16)
(KORNBERG und MORRIS, 1962)

0,10 M	Tris-HCl, pH 8,0	0,10 ml
0,01 M	$NAD(P)H_2$	0,012 ml
	Extrakt	0,02 ml
	dest. Wasser	ad 0,95 ml
nach 2 min		
0,025 M	threo-ß-Hydroxyaspartat	0,02 ml
nach weiteren 2 min		
0,02 M	erythro-ß-Hydroxyaspartat	0,01 ml
nach weiteren 2 min		
0,025 M	Oxalacetat (neutralisiert)	0,02 ml

Die Extinktionsveränderung wurde bei 340 nm verfolgt.

8.6. Glyoxylat-Aspartat-Aminotransferase (GIBBS und MORRIS, 1970)

0,5 M	KPO_4-Puffer, pH 7,1	0,10 ml
1,0 µM	Pyridoxalphosphat	0,10 ml
1,0 mM	$NAD(P)H_2$	0,15 ml
0,05 mM	Glyoxylat (frisch angesetzt u. neutralisiert)	0,10 ml
0,05 mM	L-Aspartat (neutralisiert)	0,10 ml

Extrakt 0,02 ml; dest. Wasser ad 1,00 ml

Die Reduktion des gebildeten Oxalacetats zu Malat wurde bei 340 nm verfolgt.

8.7. Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (EC 2.6.1.12) (verändert nach RICHARDSON und THOMPSON, 1970)

0,1 M	Natriumglyoxylat	0,25 ml
0,5 mM	Pyridoxalphosphat	0,05 ml
0,2 M	Borsäure, 0,2 M KCl, pH 8,4 (eingest. mit NaOH)	1,00 ml
	Extrakt	0,2 - 0,5 ml
0,1 M	Alanin	0,25 ml

Der Ansatz wurde mit Alanin gestartet, 5 min bei 37° C inkubiert und dann mit 0,3 ml 3 M Trichloressigsäure abgestoppt. Der Ansatz wurde mit 5 N NaOH wieder neutralisiert. Aus diesem so behandelten Ansatz wurden 0,3 ml entnommen und auf den Gehalt an Pyruvat untersucht.

	Probe	0,3 ml
0,1 ml	Tris-HCl, pH 8,3	1,0 ml
	LDH (1 : 100 verd.)	0,01 ml
0,01 M	$NADH_2$	0,1 ml
	dest. Wasser	ad 3,00 ml

Es wurde die Menge des gebildeten Pyruvats bei 340 nm gemessen.

In Abwandlung der Vorschrift wurde nicht die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration bestimmt (THOMPSON und RICHARDSON, 1968), sondern die Gesamtmenge des Pyruvats. In beiden Fällen mußte darauf geachtet werden, daß das noch im Test befindliche Glyoxylat durch den Tris-Puffer quantitativ als Schiff'sche Base abgefangen wurde, da sonst auch das Glyoxylat mit dem LDH umgesetzt wurde (THOMP-

SON und RICHARDSON, 1968).

8.8.a. Serin-Transhydroxymethylase (EC 2.1.2.1) (SCRIMGEOUR und HUENNEKENS, 1953)

0,5 M	Glycin	0,10 ml
0,025 M	Formaldehyd	0,10 ml
	DL-Tetrahydrofolsäure (3 mg/ml)	0,10 ml
0,5 M	KPO_4-Puffer, pH 7,5	0,15 ml
0,3 mM	Pyridoxalphosphat	0,10 ml
	Extrakt	0,1 - 0,4 ml
	dest. Wasser	ad 1,00 ml

Das Reaktionsgemisch wurde in einem 12 ml Zentrifugenglas 8 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde mit 0,3 ml 3 M TCA abgestoppt und das ausgefallene Protein 5 min bei 4 000 U abzentrifugiert. Im Überstand wurde der verbliebene Formaldehyd mit NASH's Reagenz bestimmt (NASH, 1953):

0,5 ml Testansatz
2,0 ml NASH's Reagenz (2 ml Acetylaceton
2 ml Eisessig
150 g Ammoniumacetat
Wasser ad 1 000 ml)

Dieses Testgemisch wurde 45 min bei 37° C inkubiert und dann mit Wasser auf 10 ml verdünnt. Das dabei gebildete Diacetyldihydrolutidin (DDL) wurde bei 412 nm gegen NASH's Reagenz gemessen. Als Standard für Formaldehyd wurde eine Eichkurve mit Monomethylol Dimethylhydantoin im Bereich von 0 - 1,2 µMole/Test angefertigt.

8.8.b. Herstellung von Tetrahydrofolsäure (JONES et al., 1961)

5 mg Platinoxid wurden in 2,7 ml 20 mM KPO_4-Puffer, pH 7,0 suspendiert und in den Hauptraum eines Warburggefäßes gegeben. 16 µMole Folsäure wurden in 0,3 ml 20 mM KPO_4-Puffer, pH 7,0 gelöst, der pH nachgestellt und in den Seitenarm des Warburggefäßes pipettiert. Das Reaktionsgefäß und der Manometerarm wurden mit Alufolie umwickelt, mit Wasserstoff begast und bei 37° C geschüttelt. Die H_2-Aufnahme durch den Katalysator wurde so lange verfolgt, bis kein Wasserstoffverbrauch mehr beobachtet werden konnte (30 - 40 min). Danach wurde die Folsäure aus dem Seitenarm in den Hauptraum gekippt und wieder so lange geschüttelt, bis kein Wasserstoffverbrauch mehr zu beobachten war (30 - 90 min). Die Lösung der reduzierten Folsäure wurde mit einer Enzympipette entnommen, die Glaswolle in der Spitze enthielt, um den Katalysator abzufiltern. Beim Überfüllen wurde sowohl das Warburggefäß als auch das Reagenzglas, in das die Lösung überführt wurde, mit Wasserstoff begast.

Die Lösung wurde ständig unter H_2 oder N_2 aufbewahrt (lichtgeschützt) und bei -18° C eingefroren.

8.8.c. Bestimmung der Tetrahydrofolsäure (ANDREESEN, persönliche Information)

Die hergestellte DL-Tetrahydrofolsäure wurde im Zeiss-Spektralphotometer auf seine Absorptionseigenschaften untersucht und mit den Daten von JAENICKE (1961) verglichen. Der Kurvenverlauf deutete klar auf die DL-Tetrahydrofolsäure.

Die Konzentration der hergestellten Lösung wurde mit Hilfe der Formyl-THF-Synthetase (ANDREESEN, persönliche Mitteilung) bestimmt.

Für den Test wurden folgende Lösungen hergestellt:

Ein Gemisch (Gem. 1) aus 14 M Mercaptoäthanol und 1 M TEA-Puffer, pH 8,0 im Verhältnis 1 : 1.

Ein weiteres Gemisch (Gem. 2) wurde aus folgenden Substanzen hergestellt: 1 M TEA-Puffer, pH 8,0; 0,2 M Na-Formiat; 0,1 M $MgCl_2$ und 50 mM ATP in Verhältnis 1 : 1 : 1 : 1.

Der Test wurde wie folgt durchgeführt:

Gem. 1	(TEA/MET)	0,02 ml
Gem. 2	(TEA/Formiat/Mg/ATP)	0,3 ml
	DL-THF in KPO_4-Puffer, pH 7,0	0,05 - 0,3 ml
0,1 M	NH_4CL	0,075 ml
	gereinigte Formyl-THF-Synthetase	0,005 ml
dest. Wasser		ad 0,75 ml

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37° C inkubiert; gemessen wurde gegen den Ansatz ohne Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Um die Molarität der THF-Lösung bestimmen zu können, mußte man THF als einzig begrenzenden Faktor zugeben. Die anderen Substanzen lagen im Überschuß vor. Dadurch war die Bildung von Methylen-THF allein von der zugegebenen Menge an THF abhängig.

Das Methylen-THF wurde bestimmt, indem 0,2 ml aus dem Reaktionsgemisch in 0,6 ml 0,36 N HCl gegeben wurden. Die optische Dichte wurde frühestens nach 10 min bei 350 nm abgelesen.

Der Extinktionskoeffizient beträgt: E_{350} Methenyl-THF = 24,9 . 10^3 $M^{-1}cm^{-1}$ (RABINOWITZ und PRICER, 1957).

Die Herstellung und Aktivitätsbestimmung der Tetrahydrofolsäure wurde freundlicherweise von Herrn Dr. J. R. Andreesen unter Assistenz von Fräulein Heger durchgeführt.

8.9. Serin-Pyruvat-Aminotransferase

0,1 M	L-Serin	0,25 ml
0,01 M	Pyridoxalphosphat	0,05 ml
0,2 M	Borsäure, 0,2 M KCl , pH 8,4, eingestellt mit NaOH	1,0 ml
0,1 M	Na-Pyruvat	0,25 ml
	Extrakt	0,2 - 0,6 ml
	dest. Wasser	ad 1,00 ml

Das Reaktionsgemisch wurde 15, 30 und 60 min bei 37° C inkubiert, nach der angegebenen Zeit mit 0,1 ml 3 M TCA abgestoppt und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 N NaOH neutralisiert.

Danach wurde das Reaktionsgemisch auf den Gehalt an Glyoxylat untersucht.

	Probe	0,3 ml
20 mM	KPO_4-Puffer, pH 6,2	0,2 ml
10 mM	$NADH_2$	0,025 ml
	Glyoxylat-Reduktase	0,01 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt. - In Abwandlung davon wurde die Reaktion auch kontinuierlich nach dem Testansatz der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase durchgeführt. Statt des Glyoxylats wurde dieselbe Konzen-

tration an Pyruvat benutzt.

8.10. Serin-Oxalacetat-Aminotransferase (CRIPPS und NOBLE, 1973)

0,1 M	KPO_4-Puffer, pH 7,0	2,0 ml
1 mM	Pyridoxalphosphat	0,03 ml
0,01 M	$NADH_2$	0,05 ml
0,01 M	L-Aspartat (neutralisiert)	0,25 ml
0,01 M	Li-Hydroxypyruvat	0,25 ml
	Extrakt	0,4 ml
	dest. Wasser	ad 3,0 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

8.11. Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (BLACKMORE und QUAYLE, 1970)

0,1 M	KPO_4-Puffer, pH 7,1	0,5 ml
1 mM	Pyridoxalphosphat	0,01 ml
0,01 M	$NADPH_2$	0,015 ml
0,1 M	Glyoxylat (frisch neutralisiert)	0,05 ml
0,1 M	L-Serin	0,05 ml
	Extrakt	0,1 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Die Reaktion wurde mit Serin gestartet und bei 340 nm verfolgt. Die Extinktionsabnahme, die erfolgte, bevor Serin zugegeben wurde, war auf die $NADPH_2$-Oxidase und die Glyoxylat-Reduktase zurückzuführen. Diese Blindreaktionen mußten von der Gesamtreaktion abgezogen werden. Das hatte zur Folge, daß der Test nur verwendet werden konnte, wenn die Aktivität der Hydroxypyruvat-Reduktase wesentlicher höher war, als die der Glyoxylat-Reduktase.

8.12. Hydroxypyruvat-Reduktase (EC 1.1.1.29)

0,02 M	KPO_4-Puffer, pH 6,2	0,2 ml
0,01 M	$NADPH_2$	0,025 ml
0,1 M	Li-Hydroxypyruvat	0,1 ml
	Extrakt	0,25 - 0,5 ml
	dest. Wasser	ad 1,00 ml

Die Bildung des Glycerats wurde bei 340 nm verfolgt.

8.13. Glyoxylat-Reduktase (EC 1.1.1.29)

0,02 M	KPO_4-Puffer, pH 6,2	0,2 ml
0,01 M	$NADPH_2$	0,025 ml
0,1 M	Glyoxylat (frisch neutralisiert)	0,1 ml
	Extrakt	0,2 - 0,4 ml
	dest. Wasser	ad 1,00 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

8.14. Glycerat-Kinase (EC 2.7.1.31) (modifiziert nach HEPTINSTALL und QUAYLE, 1970)

0,5 M	KPO_4-Puffer, pH 7,3	0,1 ml
0,1 M	EDTA	0,01 ml
0,01 M	ATP	0,05 ml
0,1 M	$MgCl_2$	0,1 ml
0,1 M	DL-Glycerat-Na-Salz	0,01 ml
0,01 M	$NADH_2$	0,03 ml
	Phosphoglyceromutase	0,01 ml
	Enolase	0,01 ml
	Pyruvat-Kinase	0,01 ml

LDH	0,01 ml
Extrakt	0,1 ml
dest. Wasser	ad 1,00 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

In Veränderung zu dem Originaltest wurde kein Phosphoenolpyruvat zu dem Test hinzugegeben, da sich im Extrakt ATPase befand. Das dabei gebildete ADP setzte sich sofort mit dem PEP zu Pyruvat um. Eine Reaktion der Glycerat-Kinase war dadurch nicht meßbar, da das ADP nicht limitierend war.

Um die ATPase-Aktivität möglichst gering zu halten, wurde der Aufschluß in Gegenwart von 1 mM $MgCl_2$ vorgenommen. Vor dem Abzentrifugieren wurde der Extrakt 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert (ABRAMS und BARON, 1968).

Die $NADH_2$-Oxidase, die während des Tests mitgemessen wurde, wurde als Blindreaktion von der Gesamtreaktion abgezogen. Bei diesem Test muß weiterhin darauf geachtet werden, daß die Glycerinsäure nicht verunreinigt ist. Ein käufliches Präparat war so stark mit Pyruvat verunreinigt, daß es nicht für diesen Test eingesetzt werden konnte.

8.15. Serin-Dehydratase (EC 4.2.1.13) (BELLION und HERSH, 1972)

0,1 M Tris-HCl, pH 7,3	1,5 ml
1,0 M L-Serin	0,1 ml
0,02 M Pyridoxalphosphat	0,05 ml
0,01 M $NADH_2$	0,1 ml
0,01 M DTT (frisch angesetzt)	0,3 ml
LDH	0,04 ml
Extrakt	0,1 - 0,5 ml
dest. Wasser	ad 3,00 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

8.16. Pyruvat-Carboxylase (EC 6.4.1.1) (HENNING und SEUBERT, 1964)

1,0 M	Tris-HCl, pH 7,5	0,1 ml
0,1 M	$MgCl_2$	0,05 ml
0,1 M	ATP (neutralisiert)	0,01 ml
0,1 M	$KHCO_3$	0,15 ml
	Citrat-Synthase (2 mg/ml)	0,01 ml
0,1 M	Acetyl-Phosphat	0,01 ml
0,01 M	CoA	0,06 ml
	PTA (1 mg/ml)	0,01 ml
0,1 M	Na-Pyruvat	0,1 ml
	Extrakt	0,1 - 0,4 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Der Test wurde in DURHAM-Röhrchen durchgeführt, die mit Plastikstopfen verschlossen waren. Die Inkubationstemperatur betrug 30° C, die Inkubationszeit 10, 20 und 30 min. Danach wurde die Reaktion durch Kochen abgestoppt und die Probe auf Citrat untersucht.

8.17. Citratbestimmung mit Hilfe der Citrat-Lyase (DAGLEY, 1969)

0,1 M	TEA-Puffer, pH 7,5	0,5 ml
0,01 M	$NADH_2$	0,03 ml
0,01 M	$MgCl_2$	0,02 ml
	Probe (Citrat)	0,2 ml
	MDH	0,1 ml
	Citrat-Lyase (2 mg/ml)	0,02 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

8.18. PEP-Synthase (COOPER und KORNBERG, 1969)

0,5 M	Tris-HCl, pH 8,0	0,1 ml
0,1 M	$MgSO_4$	0,1 ml
0,02 M	ATP (neutralisiert)	0,25 ml
0,01 M	Na-Pyruvat	0,15 ml
	Extrakt	0,1 - 0,3 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

In den Kontrollen wurde statt ATP Wasser zugegeben. Das Testgemisch wurde ohne Extrakt 30° C für 3 min vorinkubiert. Dann erfolgte der Start durch Zugabe des Extrakts. Nach 0, 5, 10 und 15 min wurden 0,1 ml Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen und auf den Gehalt an Pyruvat nach folgendem Testansatz untersucht:

	Probe	0,1 ml
0,1 %	2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2 N HCl	0,2 ml
	dest. Wasser	0,9 ml

Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei 30° C inkubiert. Darauf erfolgte die Zugabe von 1,8 ml 10 % NaOH. Nach 10 min wurde gegen die Kontrolle ohne ATP bei 436 nm gemessen. Eine Eichkurve wurde mit Dinitrophenylhydrazin und Pyruvat bei 436 nm aufgenommen.

8.19. PEP-Carboxylase (EC 4.1.1.32) (modifiziert nach KLEMME, 1973)

1 M	Tris-HCl, pH 7,2	0,1 ml
10 mM	$NADH_2$	0,025 ml
	MDH	0,01 ml
1 M	$KHCO_3$	0,05 ml
0,1 M	$MnCl_2$	0,01 ml

0,1 M	PEP	0,05 ml
	Extrakt	0,1 - 0,4 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

8.20. Phosphoroklastisches System (BUCHANAN et al., 1963; Acetyl-Phosphatbestimmung, verändert nach Boehringer Information, 1971)

1 M	Na-Pyruvat	0,05 ml
0,22 M	KPO_4-Puffer, pH 6,5	0,1 ml
1 mM	CoA	0,05 ml
	Extrakt	0,2 - 0,8 ml
	PTA	0,01 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Das Reaktionsgemisch wurde bei 37° C inkubiert und dann mit 0,5 ml 2 M neutralisiertem Hydroxylamin abgestoppt. Nach weiteren 10 min wurden hinzugefügt:

0,6 M TCA	0,1 ml
60 mM $FeCl_3$	4,0 ml

Die Extinktion wurde bei 500 nm gemessen.

8.21. Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (ANDREESEN et al., 1974)

1 M	KPO_4-Puffer, pH 7,0	0,1 ml
1 mM	CoA	0,02 ml
0,1 M	MET	0,25 ml
0,1 M	Methylviologen	0,1 ml
0,1 M	Na-Pyruvat	0,05 ml

0,01 M $MnSO_4$	0,1 ml
0,01 M TPP	0,05 ml
Extrakt	0,20 ml
dest. Wasser	ad 1,0 ml

Die Zellen wurden in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 mit 25 mM MET aufgenommen und durch die Frenchpresse gegeben. Nach dem Zentrifugieren bei 15 000 U wurde das Röhrchen mit dem Extrakt mit einer Gummikappe versehen und laufend mit Stickstoff begast.

Das Reaktionsgemisch ohne den Extrakt wurde 10 min in der Küvette mit Stickstoff begast. Dann wurde der Extrakt mit einer Hamiltonspritze hinzugegeben.

Die Extinktionsänderung wurde bei 600 nm verfolgt.

8.22. Spaltung von α-Hydroxyglutarat (PORTER und MERRETT, 1970)

0,1 M Tris-HCl, pH 8,0	1,0 ml
0,1 M α-Hydroxyglutarat	0,18 ml
0,1 M Cystein-HCl	0,2 ml
Extrakt	0,5 ml
dest. Wasser	ad 3,0 ml

Das Reaktionsgemisch wurde 20 - 60 min bei 30° C inkubiert. Dann wurden 0,5 ml aus dem Reaktionsgemisch entnommen und auf den Gehalt an Glyoxylat nach folgendem Testansatz untersucht:

	Probe	0,5 ml
0,6 M	TCA	0,2 ml
0,1 %	Dinitrophenylhydrazin in 2 N HCl (frisch angesetzt)	0,4 ml
	dest. Wasser	0,4 ml
		1,5 ml

Das Reaktionsgemisch wurde 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert und dann gegen die Kontrolle ohne Extrakt bei 436 nm gemessen.

Eine Eichkurve wurde mit Dinitrophenylhydrazin und Glyoxylat bei 436 nm aufgenommen.

8.23. Acetatbestimmung (HOLZ und BERGMEYER, 1970)

0,1 M	TEA-Puffer, pH 7,4 + 20 mM $MgCl_2$	0,5 ml
84 mM	ATP (neutralisiert)	0,1 ml
2 M	Hydroxylamin (neutralisiert)	0,2 ml
	Probe bzw. 5 mM Acetat-Standard	0,2 ml
	dest. Wasser	-
	Acetat-Kinase (5 mg/ml)	0,02 ml

Es wurden folgende Kontrollen pro Probe durchgeführt: Reagenzienleerwert (= ohne Probe oder Standard), Probenleerwert (= ohne Acetat-Kinase), Standard (= statt Probe 0,2 ml 5 mM Acetat). Die Reaktionsgemische wurden genau 90 min bei 35° C inkubiert. Dann wurde

0,6 M TCA	1,0 ml
0,06 M $FeCl_3$	4,0 ml

hinzugefügt und die Extinktion der Probe, des Probenleerwertes und des Standards, gegen den Reagenzienleerwert bei 500 nm gemessen.

Die Acetatkonzentration der Probelösung wurde durch Bezug auf die gemessene Extinktion der Acetatstandardlösung berechnet.

$$c = \frac{(E_{Probe} - E_{Probenleerwert}) \cdot 0,3 \cdot F}{E_{Standard}} \quad (g/Liter)$$

F = Verdünnungsfaktor der Probe

0,3 = Konzentration der Standardlösung der Essigsäure

Zu bemerken ist, daß die Acetatkonzentration der Probe nicht 0,6 g/l übersteigen durfte, andernfalls mußte entsprechend verdünnt werden.

8.24. Malatbestimmung (HOHORST, 1970)

	Hydrazin/Glycin Puffer, pH 9,5	0,45 ml
0,05 M	NAD	0,05 ml
	Probe	0,50 ml

Diese Komponenten wurden gemischt, der Küvetteninhalt auf Zimmertemperatur gebracht und die Extinktion E_1 zweimal im Abstand von 3 min abgelesen. Dann wurde

MDH (5 mg/ml)	0,01 ml

hinzugefügt und die Extinktion E_2 nach Ablauf der Reaktion (10 - 20 min) im Abstand von 3 min zweimal bei 340 nm abgelesen.

$$E_2 - E_1 = \Delta E$$

Die Konzentration des Malats konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$c = E \cdot 0,325 \ (\mu Mol/ml) \quad \text{bei 340 nm}$$

Herstellung des Hydrazin/Glycin-Puffers

Glycin	7,5 g
Hydrazinsulfat	5,2 g
EDTA-Na_2H_2 . 2 H_2O (in etwas H_2O gelöst)	0,2 g
2 N NaOH	51,0 ml
dest. Wasser	ad 100,0 ml

Der Puffer durfte keinen höheren pH als 9,6 haben, da es sonst bei Zugabe der MDH zu einem negativen Extinktionssprung kommen konnte.

8.25.a. Malyl-CoA-Lyase (SALEM et al., 1973)

0,5 M	KPO_4-Puffer, pH 7,4	0,2 ml
0,1 M	$MgCl_2$	0,1 ml
0,1 M	Phenylhydrazin	0,05 ml
	Extrakt	0,1 - 0,2 ml
0,8mM	Malyl-CoA	0,1 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Der Testansatz wurde bei 30° C inkubiert und entweder mit Malyl-CoA oder mit Extrakt gestartet. Die Extinktionsänderung wurde bei 324 nm verfolgt.

8.25.b. Herstellung von Malyl-CoA (EGGERER und GRÜNEWÄLDER, 1964, modifiziert nach SALEM et al., 1973)

(S)-(ß-Hydroxysuccinyl)-N-octanoylcysteamin war ein Geschenk von Herrn Prof. H. Eggerer (Universität Regensburg, Deutschland) an Herrn Prof. J. R. Quayle (Universität Sheffield, Großbritannien), der mir davon freundlicherweise 100 mg zur Verfügung stellte. (S)-(ß-Hydroxysuccinyl)-N-octanoylcysteamin (16 mg = 50 µMole) und CoA (20 mg = 26 µMole) wurden in 4 ml

0,2 M $KHCO_3$ gelöst. (S)-(ß-Hydroxysuccinyl)-N-octanoylcysteamin löste sich sehr schwer. Es mußte daher mit einem Glasstab zerstößelt werden. Nachdem sich alles gut gelöst hatte, fügte man 1 ml Diäthyläther hinzu, der mit Al_2C_3 peroxidfrei gemacht worden war. (Diäthyläther lief über eine 2,5 x 5 cm Al_2O_3-Säule). Das Gemisch aus Diäthyläther, (S)-(ß-Hydroxysuccinyl)-N-octanoylcysteamin und CoA wurde eine Stunde kräftig mit der Hand geschüttelt.

Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 2 Stunden kontinuierlich in einer Extraktionsapparatur extrahiert. Der Äther zum Extrahieren war ebenfalls peroxidfrei gemacht worden. Der Teil der Extraktionsapparatur, der die wässrige Phase beinhaltete, wurde mit einem Eisbad auf 0° C gehalten.

Nach 2 Stunden wurde die Ätherphase dekantiert und die verbleibende Wasserphase mit 5 N HCl auf pH 4,0 eingestellt. Die Einstellung des pH-Wertes wurde ebenfalls bei 0° C vorgenommen.

Die nun angesäuerte wässrige Phase wurde weiter 3 Stunden mit peroxidfreiem Äther extrahiert (die wässrige Phase wurde weiter bei 0° C gehalten).

Danach wurde der Äther dekantiert und die wässrige Phase mit einem N_2-Strom durchblasen, um den gelösten Äther zu entfernen (1 - 2 Stunden).

Die entstandene Lösung von (2S)-4-Malyl-CoA (ungefähr 0,8 mM) wurde bei -18° C gelagert.

8.26. Bestimmung der Konzentration der Malyl-CoA-Lösung (GOTTSCHALK et al., 1972)

0,2 M	Tris-HCl-Puffer, pH 8,0	0,1 ml
0,01 M	DTNB	0,1 ml
	Malyl-CoA	0,1 ml
	Citrat-Synthase	0,01 ml
	dest. Wasser	ad 1,0 ml

Die Bestimmung beruhte darauf, daß Citrat-Synthase die Fähigkeit hat, Malyl-CoA zu hydrolisieren. Die Reaktion wurde mit Citrat-Synthase gestartet. Die Extinktionsänderung wurde bei 412 nm verfolgt.

Aus der Extinktionsänderung, dem molaren Extinktionskoeffizienten und der eingesetzten Menge konnte die Molarität der Malyl-CoA-Lösung errechnet werden. Die Lösung war 0,8 mM.

8.27. ATP-abhängiges Malat-spaltendes Enzym (verändert nach HERSH und BELLION, 1972)

0,1 M	KPO_4-Puffer, pH 7,2	1,5 ml
0,1 M	Phenylhydrazin	0,09 ml
0,06 M	ATP	0,15 ml
0,1 M	$MgCl_2$	0,15 ml
0,01 M	CoA	0,039 ml
0,1 M	Malat (neutralisiert)	0,3 ml
	Extrakt	0,3 ml
	dest. Wasser	ad 3,0 ml

Die Reaktion wurde bei 324 nm verfolgt.

9. Manometrische Messungen

Die manometrischen Messungen erfolgten in einer Rund-Warburg-Apparatur (Firma BRAUN, Melsungen) bei 30° C nach den von UMBREIT et al. (1964) beschriebenen Vorschriften. Die Versuche wurden in einarmigen 15 ml Warburggefäßen durchgeführt. Nach dem Beschicken der Gefäße wurden sie mit dem Warburgmanometer verbunden und 20 min mit N_2 durchströmt. Anschließend wurden die Hähne geschlossen und die Reaktion durch Kippen des Seitenarminhaltes in den Hauptraum gestartet.

9.1. Glyoxylat-Carboligase (KRAKOW und BARKULIS, 1956; KALTWASSER, 1968)

Hauptraum:	0,22 M	KPO_4-Puffer, pH 6,4	0,3 ml
	0,005 M	TPP	0,15 ml
	0,05 M	$MgCl_2$	0,1 ml
		Extrakt	0,2 - 0,8 ml
		dest. Wasser	1,6 - 1,0 ml
Seitenarm:	1,0 M	Glyoxylat (neutralisiert)	0,15 ml

Bei diesem manometrischen Test wurde das bei der Reaktion entstehende CO_2 bestimmt. Einige Versuche wurden auch mit einem Zusatz von 0,02 ml 1 M MET durchgeführt.

10. Dünnschichtchromatographie (STAHL, 1967)

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Celluloseplatten durchgeführt. Gut gesäuberte Glasplatten wurden mit einer 0,25 mm dicken Schicht aus Cellulose-Gips (MN 300 G, Firma Machery & Nagel, Düren) überzogen und an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Platten ohne weitere Vorbehandlung für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

Als Fließmittel für die Dünnschichtchromatographie wurde n-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser im Verhältnis 30 : 30 : 6 : 15 benutzt.

Um ein zu schnelles Wandern der Substanzen am Rande der Platten zu vermeiden (Randphänomen), wurde ein 15 x 40 cm^2 langes Filterpapier U-förmig in den Glastrog gelegt und mit dem bereits eingefüllten Fließmittel getränkt. Das Papier wurde an beiden Seiten angedrückt.

10.1.a. Serin-Glyoxylat-Aminotransferase

10.2.a. Serin-Pyruvat-Aminotransferase

10.3.a. Serin- α-Ketoglutarat-Aminotransferase

10.4. Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (BLACKMORE und QUAYLE, 1970)

0,1	M	KPO_4-Puffer, pH 7,1	0,5 ml
0,001	M	Pyridoxalphosphat	0,01 ml
0,1	M	Na-Glyoxylat für Ansatz I, IV	0,05 ml
0,1	M	Na-Pyruvat für Ansatz II	
0,1	M	α-Ketoglutarat für Ansatz III	
0,1	M	Serin I, II, III	0,05 ml
0,1	M	Alanin für Ansatz IV	
		Extrakt	0,2 ml
		dest. Wasser	ad 1,0 ml

Nachdem der Extrakt über eine G 25-Säule gegeben worden war, wurden die Reaktionsgemische 4 Stunden bei 30° C inkubiert. Dann wurden 6 µl eines jeden Ansatzes auf eine Cellulose-Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen und die Substanzen mit dem oben angegebenen Laufmittel getrennt. Nach dem Lauf wurde die Platte getrocknet und die Aminosäuren mit Nin-

hydrin sichtbar gemacht.

Chemikalien und Enzyme

Im allgemeinen wurden die handelsüblichen p. a. Chemikalien der Firma MERCK (Darmstadt) benutzt. Von der Firma SCHUCHARDT-MERCK, München, wurde Naphthalin bezogen. Von der Firma DIFCO Laboratories (Detroit, Michigan, USA) stammte der Hefeextrakt, der Bacto-Agar und das AC-Medium. Von der Firma FLUKA AG (Buchs SG, Schweiz) wurde 2-Mercaptoäthanol, Isocitronensäure-tri-Natriumsalz und Alanin bezogen. BRITISH DRUG HOUSE (Poole, England) lieferte L-Serin, Dimedon, Pyridoxalphosphat und Natriumglyoxylat. Von RIEDEL DE HAEN (Seelze, Hannover) stammte das L-Cysteinhydrochlorid. Von SERVA (Feinbiochemica, Heidelberg) kamen 5,5'-Dithio-bis-nitrobenzoat, Avidin, Methylviologen und Rinderserumalbumin. Von CALBIOCHEM (Los Angeles, California) stammten threo-ß-Hydroxyaspartat und erythro-ß-Hydroxyaspartat. SIGMA (Chemical Company) lieferte DL-Glycerinsäure und Dithiothreitol. Von NBC (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) wurde Hydroypyruvat-Lithium-Salz bezogen. C. F. BOEHRINGER (Mannheim) lieferte folgende Chemikalien: Coenzym A (Trilithium-Salz), NAD, $NADH_2$ NADP, $NADPH_2$, ATP, GTP, Phosphoenolpyruvat, Lactat-Dehydrogenase (10 mg/ml), Malat-Dehydrogenase (5 mg/ml), Glyoxylat-Reduktase (1 mg/ml), Enolase (2 mg/ml), Pyruvat-Kinase (10 mg/ml), Citrat-Synthase (2 mg/ml), Phosphotransacetylase (1 mg/ml), Citrat-Lyase, Glutamat-Dehydrogenase, Acetat-Kinase (5 mg/ml) und Phosphoglyceromutase (5 mg/ml). Die radioaktiven Substanzen wie DL-3-^{14}C-Serin und $NaH^{14}CO_3$ wurden von THE RADIOCHEMICAL CENTRE (Amersham, England) bezogen.

C. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

I. Wachstumsphysiologische Untersuchungen

1. Wachstum auf Citrat, Malat und Acetat

Rhodopseudomonas gelatinosa ist einer der wenigen Vertreter der Rhodospirillaceae (Athiorhodaceae), der auf Citrat zu wachsen vermag. Außer R. gelatinosa können noch zwei Stämme von Rhodopseudomonas acidophila auf Citrat wachsen, wie von PFENNIG (persönliche Mitteilung) festgestellt wurde. Ebenso konnte PFENNIG eine von VAN NIEL (1944) nachgewiesene schwache Citratverwertung bei Rhodopseudomonas sphaeroides bestätigen.

SCHAAB (1971) hatte sich mit dem Verlauf der Citratverwertung bei R. gelatinosa beschäftigt und dabei festgestellt, daß dieses Bakterium im Zuge der Citratverwertung große Mengen von Acetat und kleine Mengen an Malat ausschied. Diese wurden erst dann genutzt, wenn das Citrat vollständig verbraucht worden war. Es konnte ein Abknicken der Wachstumskurve beobachtet werden, sobald kein Citrat mehr vorhanden war und nur noch die Spaltprodukte Malat und Acetat vorlagen.

Ein Experiment, das nach den Angaben von SCHAAB (1971) durchgeführt wurde und bei dem nur die Wiederverwertung des Ausscheidungsproduktes Malat gemessen wurde, ist in Abb. 1 dargestellt. Deutlich ist die Wachstumsverzögerung bei Citrataufbrauch und die sich anschließende Verwertung des Malats zu sehen.

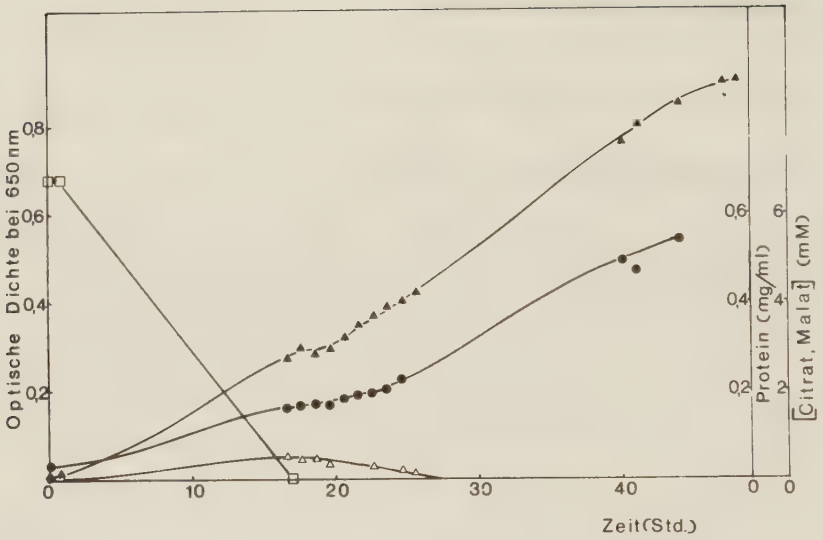


Abb. 1 Wachstum von R. gelatinosa auf 0,2 % Citrat und Verwertung des ausgeschiedenen Malats

▲ = optische Dichte; ● = Protein; △ = Malat; □ = Citrat

Die Kultur wurde in 5 l-Flaschen bei ca. 2 400 Lux mit 0,2 % Tri-Natrium-citrat-2-hydrat angezogen (s. "Methoden"). In Abständen wurden Proben entnommen und Zelltrübung, Protein, Citrat und Malatverbrauch, wie unter "Methoden" beschrieben, bestimmt.

Bei den Wachstumsversuchen auf Citrat hatte SCHAAB (1971) festgestellt, daß bei der Spaltung des Citrats der Malatgehalt um eine Zehnerpotenz niedriger lag als der Acetatgehalt und daß dieses Malat eher verbraucht war als das Acetat. Um beobachten zu können, ob die Verwertung beider Substrate nacheinander oder nebeneinander erfolgte, wurde ein Wachstums-experiment mit 3 mM Acetat und 1 mM Malat angesetzt.

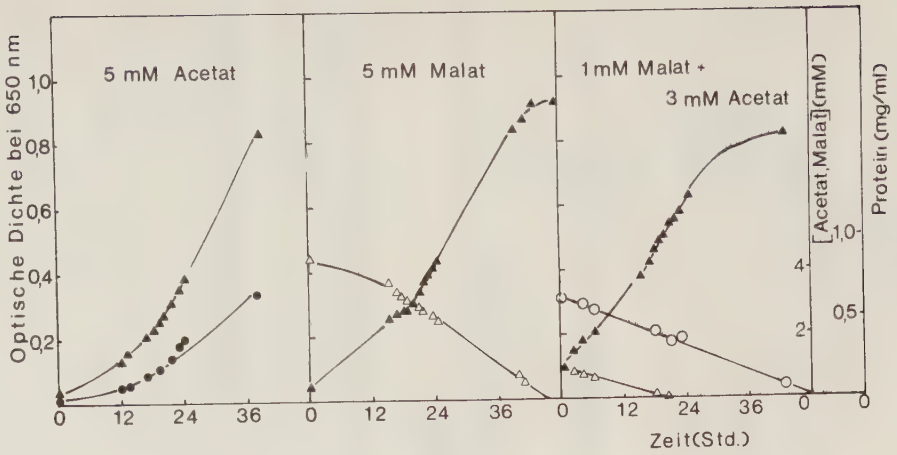


Abb. 2 - 4 Wachstumskurven von R. gelatinosa auf 5 mM Acetat (Abb. 2), auf 5 mM Malat (Abb. 3) und auf 1 mM Malat + 3 mM Acetat (Abb. 4)

▲= opt. Dichte; ●= Protein; Δ= Malat; o= Acetat

Die Kulturen wurden in 5 l-Flaschen bei 2 400 Lux angezogen. In den Proben wurden Trübung, Proteingehalt und Substratverbrauch, wie unter "Methoden" beschrieben, bestimmt.

Es sollte auch festgestellt werden, ob bei sukzessivem Verbrauch der Substrate eine Diauxie zu beobachten wäre. Als Kontrolle wurde jeweils eine Wachstumskurve mit 5 mM Acetat und mit 5 mM Malat durchgeführt. Wie aus den Kurven ersichtlich ist, wurden Malat und Acetat gleichzeitig verbraucht.

Die im Vergleich zu Acetat geringe Ausscheidung von Malat hängt also nicht damit zusammen, daß schon ausgeschiedenes Malat bevorzugt wiederverwertet wird. Vielmehr muß angenommen werden, daß der größte Teil des bei der Citratspaltung entstehenden Oxalacetats für Syntheseprozesse oder für die Oxydation zu Acetat benutzt wird.

II. Nachweis der Malyl-CoA-Lyase und der Enzyme des Glyoxylatzyklus in zellfreien Extrakten

1. Bestimmung der Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase-Aktivität von R. gelatinosa nach Wachstum auf Acetat

Nach KORNBERG und KREBS (1957) erfordert das Wachstum auf Acetat eine anaplerotische Sequenz, die sicherstellen muß, daß die C_4-Dicarbonsäuren des TCC aus dem Acetat gebildet werden können. In vielen Organismen wird diese Funktion vom Glyoxylatzyklus übernommen, an denen zwei Enzyme, die Isocitrat-Lyase (SMITH und GUNSALUS, 1954) und die Malat-Synthase (WONG und AJL, 1956), beteiligt sind.

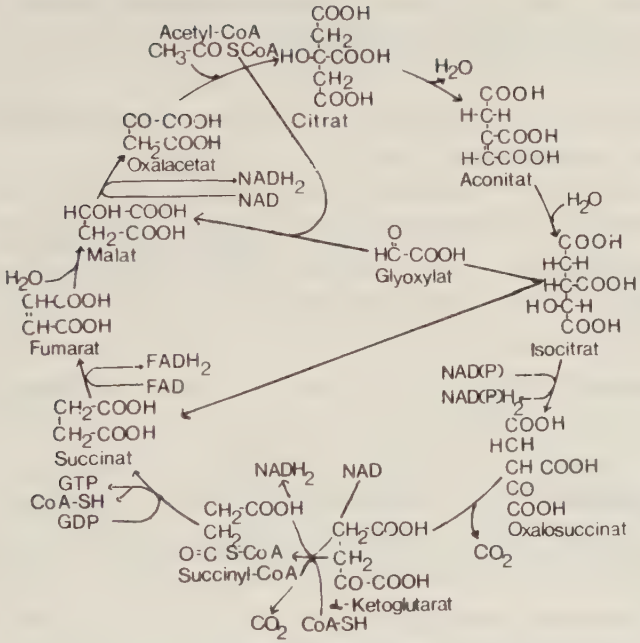


Abb. 5 Der Tricarbonsäurezyklus (TCC) mit der anaplerotischen Sequenz des Glyoxylsäurezyklus

Da R. gelatinosa selbst bei Wachstum auf Citrat wegen der schnellen Spaltung des Citrats durch die Citrat-Lyase den Hauptteil der Wachstumsperiode auf Acetat wächst, war es interessant festzustellen, ob die Enzyme des Glyoxylatzyklus in R. gelatinosa vorhanden waren.

Hierzu wurden zellfreie Extrakte von R. gelatinosa untersucht, die anaerob im Licht auf 20 mM Acetat gewachsen waren. Dabei stellte sich heraus, daß R. gelatinosa über Isocitrat-Lyase-Aktivität verfügte. Es konnte allerdings unter diesen Wachstumsbedingungen keine Malat-Synthase-Aktivität nachgewiesen werden. Unter aeroben Bedingungen im Dunkeln hingegen konnte so-

wohl Isocitrat-Lyase als auch Malat-Synthase festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2 Enzyme des Glyoxylatzyklus bei Rhodopseudomonas gelatinosa nach Wachstum auf Acetat

Wachstumsbedingungen	Spez. Aktivität (E/g Protein) Isocitrat-Lyase	Malat-Synthase
Acetat aerob-dunkel	149,0	149,0
Acetat anaerob-hell	87,6	<2,0

Die spez. Aktivitäten wurden im Rohextrakt bestimmt.

Testansatz für die Isocitrat-Lyase (3 ml Volumen): 66 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2, 5 mM $MgCl_2$, 3,3 mM Phenylhydrazin, 2 mM Cystein-HCl (neutralisiert), 3,3 mM Na-Isocitrat und Extrakt. Die Reaktion wurde mit Isocitrat gestartet und die Extinktionszunahme bei 324 nm verfolgt.

Testansatz für die Malat-Synthase (1 ml Volumen): 50 mM Tris-HCl, pH 8,4, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM Acetyl-CoA, 2 mM Glyoxylat und Extrakt. Die Reaktion wurde mit Glyoxylat gestartet und die Reaktion bei 232 nm verfolgt. Der Test mußte in einer Quarzküvette durchgeführt werden.

2. Einfluß verschiedener Substrate auf die Enzyme des Glyoxylatzyklus

a) Isocitrat-Lyase

KORNBERG (1966) berichtete, daß bei Escherichia coli und Salmonella typhimurium die Isocitrat-Lyase bei Wachstum auf Acetat höher liegt als bei Wachstum auf Lactat. Das Enzym liegt in diesen Organismen offensichtlich nicht konstitutiv vor, sondern wird induziert. Diese Frage sollte auch bei

R. gelatinosa untersucht werden. Dazu wurden Proben während einer Wachstumskurve entnommen, bei der die Zellen auf Citrat + Acetat wuchsen. Die Zellen wurden auf ihren Gehalt an Citrat, Malat, Acetat und Isocitrat-Lyase Aktivität untersucht.

Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, war während der Wachstumsperiode auf Citrat nur eine Grundaktivität von 7,44 E/g Protein an Isocitrat-Lyase zu beobachten. Während des Wachstums auf Malat stieg die Aktivität auf 22,34 E. Zum Ende der Wachstumskurve, als nur noch Acetat im Medium vorlag, wurde für die Isocitrat-Lyase eine spezifische Aktivität von 35,6 E/g Protein gemessen. Wie aus Abb. 6 zu ersehen ist, stieg zu diesem Zeitpunkt die Isocitrat-Lyase-Aktivität noch an. Dadurch ist zu erklären, daß die Isocitrat-Lyase-Aktivität nicht den Wert aufwies, der im allgemeinen bei Kulturen gemessen wurde, wenn sie von Anfang an auf vergleichbaren Konzentrationen an Acetat gewachsen waren (Tab. 3). Die zu niedrige Aktivität der Isocitrat-Lyase ist also wohl damit zu erklären, daß das Enzym relativ langsam induziert wurde.

Untersucht wurde weiterhin, inwieweit die Isocitrat-Lyase-Aktivität von der Konzentration des Nährsubstrats abhängig war. WEGENER et al. (1969) hatten nämlich bei E. coli E26 festgestellt, daß die Isocitrat-Lyase-Aktivität umso größer war, je höher die Propionatkonzentration (Nährsubstrat) war. Sie konnten aber keine solche Abhängigkeit feststellen, wenn die Zellen auf unterschiedlichen Acetatkonzentrationen gewachsen waren. Um den Einfluß der Substratkonzentration auf den Enzympegel zu testen, wurde R. gelatinosa auf 2 mM, 5 mM, 10 mM und 20 mM Acetat anaerob im Licht angezogen. Die Kulturen wurden während der späten log-Phase abgeerntet und die Zellen auf ihre Isocitrat-Lyase-Aktivität untersucht. Wie sich aus Tabelle 3 ergibt, hatte die Acetatkonzentration starken Einfluß auf die Aktivität der Isocitrat-Lyase.

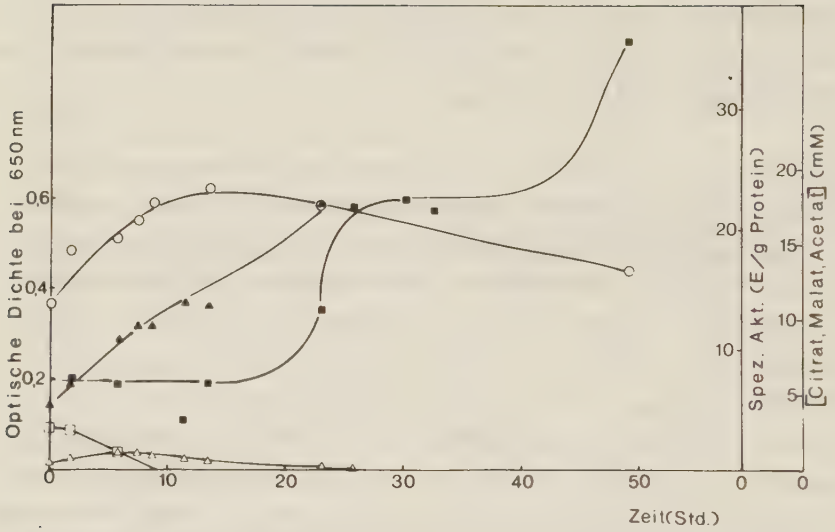


Abb. 6 Wachstumskurve von R. gelatinosa auf 0,1 % Citrat + 11,0 mM Acetat

▲= opt. Dichte; O= Acetat; △= Malat; □= Citrat; ■= spez. Akt. der Isocitrat-Lyase (E/g Protein)

Die Kultur wurde in einer 5 l-Flasche bei 2 400 Lux angezogen. In den Proben wurden Trübung, Citrat, Malat, Acetat und Aktivität der Isocitrat-Lyase, wie unter den "Methoden" beschrieben, gemessen.

Tab. 3 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Isocitrat-Lyase von der Acetat-Konzentration des Nährmediums

Acetatkonzentration (mM)	Spezifische Aktivität (E/g Protein)
2	26,6
5	42,0
10	87,2
20	149,0

Die Testbedingungen sind wie unter "Methoden" oder "Tab. 2" beschrieben.

Mit diesen Befunden kann man nicht den Verlauf der in Abb. 6 wiedergegebenen Wachstumskurve erklären. Die Acetatkonzentration betrug am Anfang 11,0 mM und am Ende 13,0 mM. Der Konzentrationsunterschied ist wohl zu gering, um das Ansteigen der Isocitrat-Lyase-Aktivität mit der Änderung der Acetatkonzentration erklären zu wollen.

In den folgenden Versuchen sollte festgestellt werden, inwieweit andere Substrate, die auch von R. gelatinosa verwertet werden können, mit Hilfe der Isocitrat-Lyase umgesetzt werden können.

Hierzu wurden die Zellen auf Formiat angezogen, da schon WERTLIEB und VISHNIAC (1967) und KLEMME (1968) berichtet hatten, daß einige Stämme von R. gelatinosa Formiat zu verwerten vermögen. Das Wachstum auf 20 mM Formiat war ausgezeichnet. Die optische Dichte betrug 0,59 bei 650 nm. Die Isocitrat-Lyase konnte allerdings nur mit einer Aktivität von 11,1 E/g Protein nachgewiesen werden.

Weiterhin vermag R. gelatinosa auf Glycolat zu wachsen. Auch hier konnte die Isocitrat-Lyase nur mit einer Aktivität von 9,8 E/g Protein festgestellt werden.

In Tab. 4 sind zum Vergleich neben den eben erwähnten Substraten noch die Aktivitäten der Isocitrat-Lyase nach Wachstum auf Citrat, Malat und Acetat angegeben. Aus der Tabelle ist klar zu ersehen, daß nur Acetat in vollem Umfange mit Hilfe der Isocitrat-Lyase umgesetzt wurde.

Tab. 4 Isocitrat-Lyase-Aktivität in R. gelatinosa bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Wachstumsbedingungen	Spez. Aktivität (E/g Protein)
Citrat (0,2 %)	
anaerob-hell	7,5
Malat (5 mM)	
anaerob-hell	21,0
Malat (5 mM)	
aerob-dunkel	32,6
Formiat (20 mM)	
anaerob-hell	11,1
Glycolat	
anaerob-hell	9,8
Acetat	
anaerob-hell	149,0

Die spez. Aktivität wurde wie unter den "Methoden" oder "Tab. 2" beschrieben festgestellt.

b) Malat-Synthase

FALMAGNE et al. (1965, 1973) stellten bei E. coli zwei verschiedene Malat-Synthasen fest. Die Malat-Synthase A ist zuständig für das Wachstum auf Acetat, die Malat-Synthase G für das Wachstum auf Glycolat.

Um zu sehen, ob R. gelatinosa bei anaerobem Wachstum im Licht mit Glycolat als Nährstoffquelle Malat-Synthase-Aktivität aufwies, wurde der Organismus auf Na-Glycolat angezogen. Nach beendetem Wachstum wurden die Zellen auf ihren Gehalt an Malat-Synthase untersucht.

Da auch unter diesen Bedingungen keine Malat-Synthase zu finden war, kann angenommen werden, daß R. gelatinosa anaerob im Licht weder Malat-Synthase A noch Malat-Synthase G zu bilden vermochte (Tab. 5). Bei Wachstum auf Formiat und Citrat konnte ebenfalls keinerlei Malat-Synthase-Aktivität festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab. 5 Malat-Synthase-Aktivität bei R. gelatinosa bei Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

Wachstumsbedingungen	Spez. Aktivität (E/g Protein)
Acetat (20 mM)	
anaerob-hell	<2,0
Acetat (20 mM)	
aerob-dunkel	149,0
Citrat (0,2 %)	
anaerob-hell	<6,3[+)]
Na-Glycolat	
anaerob-hell	<1,3
Formiat (20 mM)	
anaerob-hell	<1,6

Die Aktivität wurde, wie unter den "Methoden" oder "Tab. 2" beschrieben, ermittelt.

[+)]Die Messung der Malat-Synthase bei Citrat-gewachsenen Zellen wurde durch eine sehr große Blindreaktion gestört, die auch in Abwesenheit von Glyoxylat ablief. Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um eine Phosphotransacetylase-Aktivität, die das zugesetzte Acetyl-CoA zu Acetylphosphat umwandelte. Dadurch wurde CoA-SH frei. Die PTA-Aktivität wurde nach STADTMAN (1955) durch 0,1 ml einer gesättigten NaCl-Lösung vollständig gehemmt. Danach konnte die Malat-Synthase in der oben angegebenen Aktivität gemessen werden. Es gab aber keine Möglichkeit zu prüfen, inwieweit diese hohe Konzentration an NaCl auch einen hemmenden Einfluß auf die Malat-Synthase hatte.

3. Versuche zum Nachweis von Malyl-CoA-Lyase in R. gelatinosa

Durch Untersuchungen von TUBOI und KIKUCHI (1962, 1965), STERN (1963), HERSH und BELLION (1972), SALEM et al. (1973, 1974), COX und ZATMAN (1973) und HERSH (1974) ist die Malyl-CoA-Lyase bei verschiedenen Organismen bekannt geworden. Sie katalysiert folgende Reaktion:

$$\text{Malyl-CoA} \longrightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{Glyoxylat}$$

Für R. gelatinosa sollte untersucht werden, ob die Malat-Synthase unter anaeroben Bedingungen im Licht deshalb nicht nachzuweisen war, weil bei diesem Organismus folgende Reaktion katalysiert wurde:

$$\text{Glyoxylat} + \text{Acetyl-CoA} \longrightarrow \text{Malyl-CoA}$$

statt

$$\text{Glyoxylat} + \text{Acetyl-CoA} \longrightarrow \text{Malat} + \text{CoA-SH}$$

Malyl-CoA wäre bei dem normalen Malat-Synthase-Test nicht zu erfassen gewesen, da die beiden Testmethoden auf der Freisetzung von CoA-SH beruhten.

R. gelatinosa wurde daher auf seine Fähigkeit hin untersucht, Malyl-CoA umzusetzen. Es zeigte sich, daß R. gelatinosa kein Malyl-CoA zu spalten vermochte. Als Vergleich wurde R. sphaeroides untersucht, da bei diesem Organismus die Malyl-CoA-Lyase zuerst beschrieben worden war. Es konnte die Spaltung von Malyl-CoA in Glyoxylat und Acetyl-CoA nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Tab. 6 Aktivität der Malyl-CoA-Lyase in R. gelatinosa nach anaerobem Lichtwachstum im Vergleich zu R. sphaeroides

Organismus	Spez. Aktivität (E/g Protein)
R. gelatinosa	<0,2
R. sphaeroides	36,8

Testbedingungen (Testvolumen 1 ml): 100 mM KPO_4-Puffer, pH 7,4, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM Phenylhydrazin, 0,1 mM Malyl-CoA und Extrakt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30° C inkubiert und die Extinktionszunahme bei 324 nm verfolgt.

Da nicht nachgewiesen werden konnte, daß R. gelatinosa Malyl-CoA verwerten konnte, wurde der Gedanke nicht weiter verfolgt, ob die Malat-Synthase-Reaktion bei R. gelatinosa statt zu Malat zu Malyl-CoA führte und dadurch im optischen Test nicht sichtbar war.

4. Nachweis von Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase in verschiedenen Rhodospirillaceae nach Wachstum auf Acetat

KORNBERG und LASCELLES (1960) berichteten, daß R. capsulata und R. palustris sowohl über Isocitrat-Lyase als auch über eine Malat-Synthase verfügten. Hingegen konnten sie bei Rsp. rubrum und R. sphaeroides Malat-Synthase nachweisen, jedoch keine Isocitrat-Lyase. Sie meinten daher, daß die Malat-Synthase bei den Rhodospirillaceae konstitutiv sei.

Auch STOKES (1970) vertrat die Meinung, daß die Malat-Synthase bei den Rhodospirillaceae konstitutiv sei. In beiden Arbeiten waren aber keine Daten über die Malat-Synthase-Aktivitäten der untersuchten Rhodospirillaceae angegeben.

Da in dieser Arbeit gefunden wurde, daß R. gelatinosa keine Malat-Synthase besaß, wenn er unter anaeroben Bedingungen im Licht gewachsen war, sollten auch andere Rhodospirillaceae noch einmal auf ihren Gehalt an Malat-Synthase überprüft werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob der Wechsel der Wachstumsbedingungen von aerob-dunkel zu anaerob-hell bei Wachstum auf 20 mM Acetat noch bei einem anderen Organismus eine Veränderung der Enzymaktivität hervorrief.

Folgende Organismen wurden zu dieser Untersuchung herangezogen: Rhodomicrobium vannielii , R. palustris, R. sphaeroides, Rsp. rubrum, Rsp. fulvum, R. capsulata, Rsp. molischianum, R. viridis und Rsp. tenue.

Die Untersuchungen legten eine Unterteilung der Organismen in 3 Gruppen nahe.

Zu der Gruppe 1 gehörten die Organismen, die sowohl über Isocitrat-Lyase als auch über Malat-Synthase verfügten. Zu ihnen gehörten: Rhodomicrobium vannielii , R. palustris und Rsp. tenue. Außerdem war R. gelatinosa zu dieser Gruppe zu zählen , wenn er aerob im Dunkeln gewachsen war.

Die Gruppe 2 war nur durch R. gelatinosa vertreten, wenn er anaerob im Licht gewachsen war. Er besaß zwar Isocitrat-Lyase aber keine Malat-Synthase.

In der Gruppe 3 waren die Organismen vertreten, die keine Isocitrat-Lyase-Aktivität aufwiesen, aber über Malat-Synthase verfügten. Hierzu gehörten R. sphaeroides, Rsp. rubrum, Rsp. fulvum, Rsp. molischianum und R. viridis.

Wie man aus Tabelle 7 entnehmen kann, war die Malat-Synthase bei allen untersuchten Organismen vorhanden, mit Ausnahme von R. gelatinosa, wenn er anaerob im Licht gewachsen war.

Tab. 7 Spezifische Aktivität der Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase in verschiedenen Rhodospirillaceae nach Anzucht unter hell-anaeroben und dunkel-aeroben Bedingungen

Stamm	anaerob-hell Spez. Akt. (E/g Prot.) ICL	MS	Zahl der Vers.	aerob-dunkel Spez. Akt. (E/g Prot.) ICL	MS	Zahl der Vers.
Rhodomicrobium vannielii St.7256	35,9	17,1	3	18,3	34,9	2
Rhodopseudomonas palustris St.17002	29,5	50,3	3	47,0	49,0	2
Rhodospirillum tenue St. 3761	40,0	14,8	3	17,6	25,6	1
Rhodospirillum tenue St. 2761	42,0	29,0	2	-	-	0
Rhodopseudomonas gelatinosa St. 2150				115,0	149,0	10
Rhodopseudomonas gelatinosa St. 2150	84,6	<2,0	10			
Rhodopseudomonas sphaeroides St. 17023	<1,2	50,8	3	1,2	82,6	2
Rhodospirillum rubrum St. Ha	<1,4	66,1	4	1,7	45,2	2
Rhodospirillum fulvum St. 1360	<0,45	16,8	2	k.W.	k.W.	-
Rhodospirillum molischianum St. N 131	<4,4	12,6	1	k.W.	k.W.	-
Rhodopseudomonas viridis St. 2750	<1,7	8,5	2	k.W.	k.W.	-
Rhodopseudomonas viridis St. R.v.F	<0,3	22,0	2	k.W.	k.W.	-
Rhodopseudomonas capsulata St. Kb 1	<2,0	192,1	4	0,35	102,1	3

k.W. = kein Wachstum; St. = Stamm

Die Organismen wurden auf 20 mM Acetat bei 27° C entweder anaerob bei 2 400 Lux oder aerob im Dunkeln angezogen. Bei der Anzucht von Rhodospirillum fulvum und Rhodospirillum molischianum wurden zu 100 ml Nährlösung 1 ml einer 5 %igen Ascorbinsäure-Lösung gegeben.

Außerdem war bei keinem der untersuchten Organismen eine nennenswerte Veränderung der Enzymaktivitäten zu beobachten, wenn bei den Organismen ein Wechsel von anaerobem Lichtwachstum zu aerobem Dunkelwachstum vorgenommen wurde. Wieder bildete R. gelatinosa eine Ausnahme.

In 3 Organismen stimmten die Ergebnisse nicht mit den Befunden von STOKES (1970) überein. Sie hatte für Rhodomicrobium vannielii keine Isocitrat-Lyase gefunden, dagegen fand sie bei R. capsulata und bei R. viridis Isocitrat-Lyase. Um diese Widersprüche zu klären, wurden die Versuche bei R. viridis, Rhodomicrobium vannielii und bei R. capsulata mehrmals mit neu angezogenen Zellen wiederholt. Jede Anzucht wurde mikroskopisch kontrolliert. Es konnte keine Verunreinigung festgestellt werden.

Für R. capsulata wurde eine zusätzliche Reinheitskontrolle nach VAN NIEL (1944) durchgeführt, um mit Sicherheit zwischen R. capsulata und R. sphaeroides unterscheiden zu können. Da sich die beiden Organismen durch ihre Kohlenstoffverwertung unterscheiden, wurden sie auf verschiedene Zuckerquellen angezogen. Das Ergebnis dieses Tests wird in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tab. 8 Kohlenstoffverwertung bei R. capsulata und R. sphaeroides

C-Quelle	R. capsulata	R. sphaeroides
0,1 % Äthanol	--	+
0,1 % Glycerin	--	+
0,1 % Mannit	--	++
0,1 % Sorbit	--	++
0,1 % Mannose	--	++
0,1 % Gluconat	--	+

Dem Grundmedium wurde 0,02 % Hefeextrakt und die angegebene C-Quelle zugeführt. Die 50 ml Fläschchen wurden anaerob im Licht inkubiert. Nach 3 Tagen wurden sie auf ihre Trübung untersucht.

Wie aus diesem Test zu ersehen ist, handelte es sich um einen reinen R. capsulata Stamm. Das unterschiedliche Ergebnis kann vielleicht damit erklärt werden, daß ein anderer Stamm als bei STOKES (1970) verwendet wurde.

Auch bei Rhodomicrobium vannielii wurde von STOKES (1970) ein anderer Stamm verwendet, so daß sich das differierende Ergebnis dadurch erklären läßt.

5. Einfluß von DTNB auf die Aktivität der Malat-Synthase der Rhodospirillaceae

Die Malat-Synthase-Aktivität wurde im allgemeinen so bestimmt, daß die Bildung von SH-CoA bei 232 nm verfolgt wurde (s. "Methoden"). Als versucht wurde, die Freisetzung des Coenzyms A mit DTNB (Ellman's Reagenz) zu verfolgen, zeigte sich, daß die Malat-Synthase von R. gelatinosa und R. palustris in Anwesenheit von DTNB zu 100 % gehemmt wurde. Es war anzunehmen, daß sich bei diesen beiden Organismen reaktive SH-Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms befanden; durch die Reaktion der SH-Gruppen mit DTNB zu 3-Carboxy-4-nitro-thiophenolat standen diese nicht mehr bei der Enzymreaktion zur Verfügung. Das Enzym war inaktiviert. Eine solche Inaktivierung ist auch bei Salmonella typhimurium für die ß-Isopropylmalat-Synthase von KOHLHAW et al. (1969) beschrieben worden.

Die Malat-Synthase von Rsp. rubrum als auch von R. sphaeroides wurde nicht in Anwesenheit von DTNB gehemmt. Es war anzunehmen, daß hier eine Reaktion von SH-Gruppen, die für die enzymatische Umsetzung von Bedeutung waren , mit dem DTNB nicht möglich war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.

Nach dem Ergebnis dieser Untersuchung war deutlich, daß es ohne Bedeutung war, ob die Malat-Synthase von Rsp. rubrum und R. sphaeroides im kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Test mit DTNB bestimmt wurde.

In jedem Fall mußte die Aktivität von R. gelatinosa und R. palustris diskontinuierlich ermittelt werden. Für R. gelatinosa konnte allerdings auch unter diesen Testbedingungen nach anaerobem Wachstum im Licht keine Malat-Synthase nachgewiesen werden.

Tab. 9 Einfluß von DTNB auf die Malat-Synthase bei verschiedenen Rhodospirillaceae

Organismus	DTNB (mM)	Spez. Aktivität (E/g Protein) a) mit DTNB während d. Reaktion	b) in Abwesenh. v. DTNB während der Reaktion
Rsp. rubrum	0,10	45,2	
	0,06	39,7	39,9
	0,03	39,7	
R. sphaeroides	0,10	45,6	
	0,06	46,3	45,6
	0,03	41,3	
R. palustris	0,10	0,0	50,2
	0,06	5,5	
	0,03	17,6	
R. gelatinosa (anaerob-hell)	0,10	0,0	105,2

Die Tests wurden wie folgt durchgeführt:

a) Kontinuierlicher Test (1 ml Volumen): 50 mM Tris-HCl, pH 8,4, 5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM Acetyl-CoA, 2 mM Glyoxylat, 0,1 mM DTNB und Extrakt. Die Reaktion wurde mit Glyoxylat gestartet und bei 412 nm verfolgt. Die Acetyl-CoA-Desacetylase-Reaktion, die vor der Zugabe von Glyoxylat ablief, wurde von der Gesamtreaktion abgezogen.

b) Diskontinuierlicher Test (1 ml Volumen): wie unter a) mit Ausnahme von DTNB. Nach 2 min Reaktionsdauer wurde DTNB (0,1 mM) hinzugegeben und die Extinktionszunahme nach einer weiteren Minute abgelesen. Danach wurde ein Testansatz ohne DTNB und Glyoxylat durchgeführt. Auch hier wurde nach 2-minütiger Reaktionszeit DTNB (0,1 mM) hinzugegeben

und die Extinktionszunahme nach einer weiteren Minute bei 412 nm abgelesen. Diese Extinktionszunahme ergab die Aktivität der Acetyl-CoA-Desacetylase und mußte von dem vollständigen Test abgezogen werden.

6. Verbreitung der Malyl-CoA-Lyase in den Rhodospirillaceae

Da von TUBOI und KIKUCHI (1962) beschrieben wurde, daß R. sphaeroides über eine Malyl-CoA-Lyase verfügt, sollte dieses Enzym auch bei anderen Rhodospirillaceae untersucht werden. Das Vorhandensein dieses Enzyms ist nach SALEM et al. (1973) für die Beurteilung der tatsächlichen Malat-Synthase-Aktivität von Bedeutung. Wenn nämlich in Umkehrung der Malyl-CoA-Lyase-Reaktion Acetyl-CoA und Glyoxylat zu Malyl-CoA umgesetzt werden, so kann bei Vorhandensein einer Malyl-CoA-Deacylase oder einer Acyl-CoA-Transferase CoA-SH freigesetzt werden. Diese Reaktionsfolge ist optisch nicht von der Malat-Synthase-Reaktion zu unterscheiden.

Tab. 10 Aktivität der Malyl-CoA-Lyase im Vergleich zur ICL- und MS-Aktivität bei verschiedenen Rhodospirillaceae nach Wachstum auf 20 mM Acetat

Organismus	Wachstumsbed.	Spez. Aktivität (E/g Protein) ICL	MS	Malyl-CoA-Lyase
R. palustris	anaerob-hell	29,5	50,3	<0,2
"	aerob-dunkel	47,0	49,0	<0,3
R. gelatinosa	anaerob-hell	84,0	<2,0	<0,2
R. sphaeroides	anaerob-hell	<1,2	50,8	39,2
Rsp. rubrum	anaerob-hell	<1,4	66,1	18,3
"	aerob-dunkel	<1,7	42,1	20,2
R. capsulata	anaerob-hell	<2,0	192,1	18,8

Testbedingungen wie unter Tab. 2 und Tab. 6.

Aus Tab. 10, in der die Werte der Malyl-CoA-Lyase-Aktivität im Vergleich zu denen der Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase aufgeführt sind, kann man ersehen, daß die Messungen der Malat-Synthase bei R. palustris, R. gelatinosa und R. capsulata kaum durch die Aktivität der Malyl-CoA-Lyase verfälscht werden konnten. Bei Rsp. rubrum und R. sphaeroides war der Unterschied zwischen den Aktivitäten der beiden Enzyme nicht so groß, als daß mit Sicherheit zwischen der Umkehrreaktion der Malyl-CoA-Lyase mit anschließender Malyl-CoA-Deacylase und einer Malat-Synthase-Reaktion unterschieden werden konnte.

Auffallend bei diesen Untersuchungen war, daß die Malyl-CoA-Lyase nur bei den phototrophen Organismen zu finden war, die keine Isocitrat-Lyase besaßen. Welche physiologische Bedeutung dies hat, konnte nicht geklärt werden.

Ergänzend sei noch erwähnt, daß die Malyl-CoA-Lyase bei R. sphaeroides nur dann nachgewiesen werden konnte, wenn Malyl-CoA Substrat war. Wenn Malyl-CoA durch Malat, ATP und CoA ersetzt wurde, zeigte sich keine Aktivität des Enzyms, obwohl die Zellen auf drei verschiedenen Substraten gewachsen waren (Acetat, Malat oder Malat und Glutamat). Das Ergebnis konnte auch nicht durch die Zugabe von Cystein oder Mercaptoäthanol verändert werden. STERN (1963) hatte diese beiden Reagenzien als positiv für die Reaktion beschrieben.

Auch bei R. gelatinosa konnte das ATP-abhängige Malat-spaltende Enzym unter den angegebenen Testbedingungen nicht nachgewiesen werden (siehe Tab. 11).

Tab. 11 ATP-abhängige Malatspaltung bei R. gelatinosa und R. sphaeroides

Organismus	Wachstumsbed.	Testbed.	Spez. Akt. (E/g Protein)
R. gelatinosa	5 mM Malat		<1,4
"	20 mM Acetat		<1,0
R. sphaeroides	5 mM Malat		<0,6
"	20 mM Acetat		<2,0
"	Malat + Glutamat	+ 14 mM MET	<0,7
"	"	+ 28 mM MET	<0,7
"	"	+ 6 mM Cystein	<0,4

Testbedingungen (Testvolumen 3 ml): 50 mM Tris-HCl, pH 8,4, 3 mM Phenylhydrazin, 3 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 0,13 mM CoA, 10 mM Malat und Extrakt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 28° C inkubiert und die Extinktionsänderung bei 324 nm verfolgt. Wenn ausdrücklich erwähnt, wurden 14 mM oder 28 mM MET oder 6 mM Cystein hinzugefügt.

III. Versuche zum Nachweis der Reaktionen, die in R. gelatinosa Glyoxylat weiter umsetzen

1. Versuche zum Nachweis des Glycerat-Weges

Bei R. gelatinosa war nach anaerobem Wachstum im Licht der Glyoxylatzyklus nur unvollständig vorhanden. Bei der Spaltung des Isocitrats wurden Glyoxylat und Succinat gebildet. Durch das Fehlen der Malat-Synthase mußte für das Glyoxylat eine Ersatzreaktion gefunden werden, bei der das Glyoxylat (C_2-Körper) in eine C_4-Dicarbonsäure umgewandelt wurde. Diese Reaktion würde zur Wiederauffüllung des TCC dienen.

Als Reaktionsfolge bot sich der von KORNBERG und GOTTO (1959) beschriebene Glycerat-Weg an. Bei dieser Sequenz können zwei Mole Glyoxylat

über mehrere Schritte zu PEP umgewandelt werden. PEP hat dann die Möglichkeit, zu Oxalacetat weiterzureagieren, wenn eine PEP-Carboxylase vorhanden ist. Die Reaktionsschritte sind in Abb. 7 zusammengefaßt.

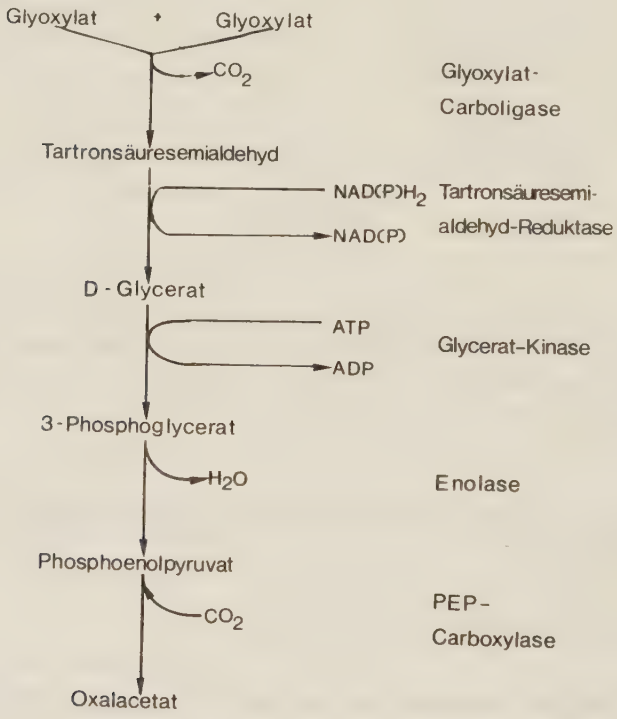


Abb. 7 Reaktionen des Glycerat-Weges nach KORNBERG und GOTTO (1959)

Von diesem Reaktionsweg wurde versucht, die Glyoxylat-Carboligase als das Schlüsselenzym des Glyceratweges nachzuweisen. Als Kontrolle wurde E. coli auf Glyoxylat-Carboligase untersucht, da dieses Enzym bei Glyco-

lat-gewachsenen Zellen von E. coli gefunden worden war.

Es zeigte sich, daß R. gelatinosa nach anaerobem Wachstum auf Acetat keine Glyoxylat-Carboligase aufwies. Auch als der Organismus in Anwesenheit von Mercaptoäthanol aufgeschlossen wurde, zeigte sich keine Aktivität des Enzyms. Ebensowenig konnte die Glyoxylat-Carboligase nachgewiesen werden, wenn R. gelatinosa auf Na-Glycolat gewachsen war. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 zusammengefaßt.

Tab. 12 Aktivität der Glyoxylat-Carboligase bei R. gelatinosa und E. coli

Organismus	Medium	Aufschlußbed.	Spez. Akt. (E/g Protein)
R. gelatinosa	Acetat	- MET	<8,4
"	Acetat	+ MET	<4,7
"	Glycolat	+ MET	<4,5
E. coli	Glycolat	- MET	3 030,0

Testbedingungen (Testvolumen 2,5 ml): 24 mM KPO_4-Puffer, pH 6,4, 0,2 mM Thiaminpyrophosphat, 2 mM $MgCl_2$, 60 mM Na-Glyoxylat und Rohextrakt. Der Versuch wurde bei 30° C im Warburg durchgeführt und die CO_2-Entwicklung gemessen.

In den Glycolat-gewachsenen Zellen von E. coli konnte dagegen die Glyoxylat-Carboligase gemessen werden (Tab. 12). Sie war streng extraktproportional (Abb. 8).

Durch das Fehlen der Glyoxylat-Carboligase zeigte sich, daß der Glycerat-Weg nicht an der weiteren Umsetzung des Glyoxylats bei R. gelatinosa beteiligt war.

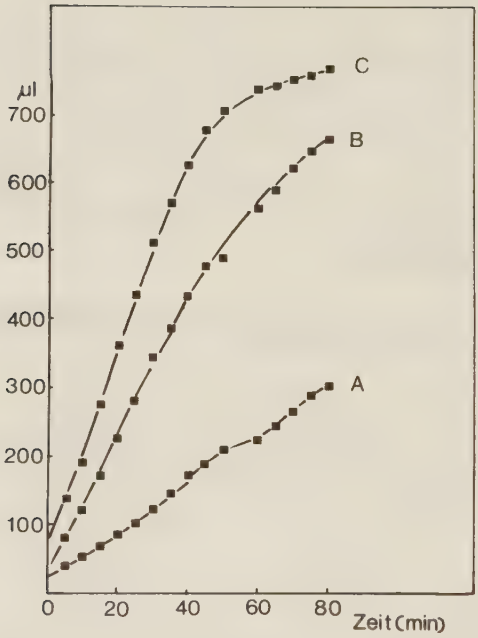


Abb. 8 Extraktabhängige Glyoxylat-Carboligase-Aktivität bei E. coli nach Wachstum auf Glycolat

Die Testbedingungen waren dieselben wie unter Tab. 9.
Kurve A = 0,1 ml Extrakt; B = 0,3 ml Extrakt; C = 0,5 ml Extrakt

2. Versuche zum Nachweis des ß-Hydroxyaspartat-Weges

Durch Untersuchungen von KORNBERG und MORRIS (1962) wurde bekannt, daß Paracoccus denitrificans (früher Micrococcus denitrificans) über eine ß-Hydroxyaspartat-Aldolase und eine ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase verfügt , wenn er auf Glycolat gewachsen ist. Diese Enzyme katalysieren die in Abb. 9 wiedergegebenen Reaktionen.

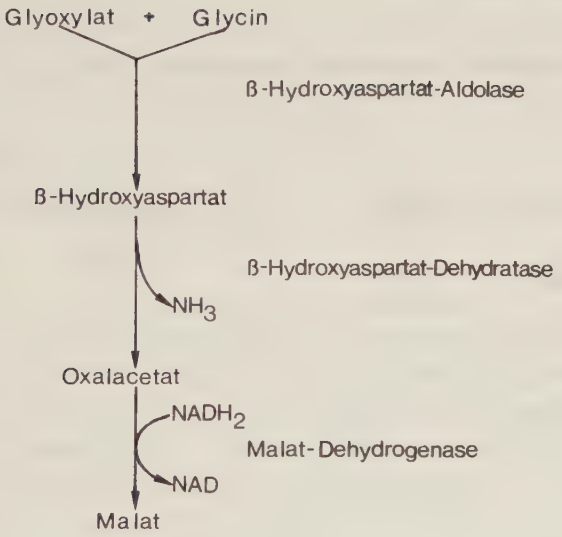


Abb. 9 Reaktionen des ß-Hydroxyaspartat-Weges nach KORNBERG und MORRIS (1962)

Der ß-Hydroxyaspartat-Weg stellt also eine Reaktionsfolge dar, bei der aus 2 C_2-Körpern eine C_4-Dicarbonsäure gebildet wird.

Es wurde nun untersucht, ob R. gelatinosa über die ß-Hydroxyaspartat-Aldolase verfügte. Es zeigte sich, daß nach Zugabe des Glyoxylats ein Extinktionsabfall erfolgte, der aber unabhängig von der Anwesenheit des Glycins war. Diese Umsetzung des Glyoxylats fand nur mit $NADPH_2$, nicht aber mit $NADH_2$ als Elektronen-Donor statt. Um auszuschließen, daß sich im Rohextrakt noch Reste von Glycin befanden, wurde der Extrakt über eine G 25-Säule gegeben. Damit wurden die niedermolekularen Bestandteile entfernt. Nach dieser Behandlung konnte weiterhin eine Extinktionsabnahme in Abwesenheit von Glycin beobachtet werden. Bei P. denitrificans hingegen konnte die Umsetzung von Glyoxylat und Glycin zu ß-Hydroxyaspar-

tat gemessen werden.

Die Reaktionsabläufe sind in Abb. 10 zusammengefaßt.

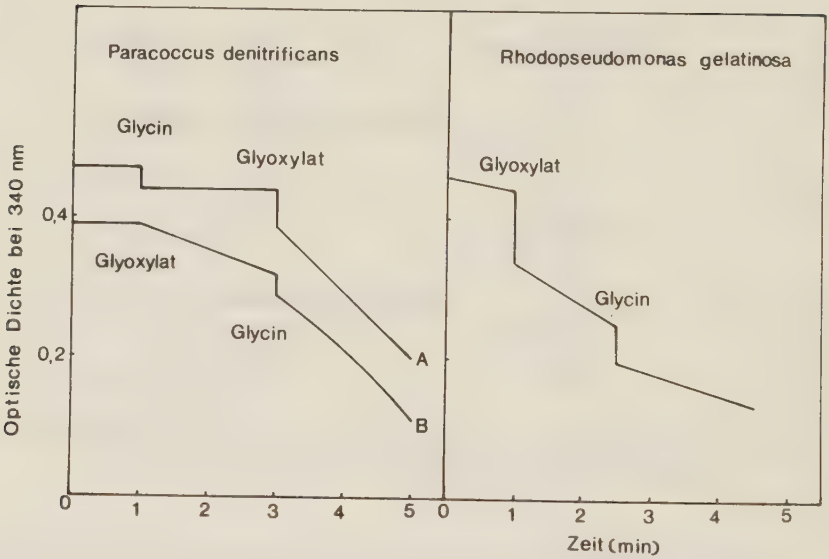


Abb. 10 Aktivität der ß-Hydroxyaspartat-Aldolase bei Paracoccus denitrificans und R. gelatinosa

Testansatz (1 ml): 10 µMole Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 µMol Pyridoxalphosphat, 0,5 µMol $MgCl_2$, Extrakt (ungefähr 0,25 mg Protein) und 0,12 µMole $NAD(P)H_2$. An den angegebenen Punkten wurden hinzugegeben: 1 µMol Glyoxylat, 5 µMole Glycin. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt. Kurve A und B unterscheiden sich nur durch die verschiedene Reihenfolge der Substratzugabe.

Die ß-Hydroxyaspartat-Aldolase konnte bei R. gelatinosa also nicht nachgewiesen werden. Da der Test der ß-Hydroxyaspartat-Aldolase die Anwe-

senheit der ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase voraussetzte, wurde untersucht, ob die ß-Hydroxyaspartat-Aldolase nicht nachzuweisen war, weil die Dehydratase fehlte. Letztere war erforderlich, um das gebildete ß-Hydroxyaspartat über Oxalacetat zu Malat unter Oxydation des $NAD(P)H_2$ umzusetzen.

Bei dem Nachweis der ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase waren zwei Faktoren zu berücksichtigen.

Bei Anwesenheit einer NADH oder NADPH-Oxidase kann eine so hohe Blindreaktion auftreten, daß die eigentliche Reaktion nach Zugabe des Substrats überdeckt wäre. Daher mußte festgestellt werden, ob eine NADH- oder NADPH-Oxidase vorhanden war. Außerdem mußte sichergestellt werden, daß sich im Rohextrakt genügend MDH befand, um die Umsetzung des gebildeten Oxalacetats zu Malat photometrisch sichtbar zu machen. Wenn sowohl eine NADH- als auch eine NADPH-abhängige MDH vorhanden war, konnte der Elektronen-Donor benutzt werden, bei dem sich die Blindreaktion am besten von der eigentlichen Reaktion unterschied. Die Verteilung der NADH- und NADPH-Oxidase und die Verteilung der NADH- und NADPH-spezifischen Malat-Dehydrogenase sind in Tab. 13 zusammengefaßt.

Wie sich aus nachstehender Tabelle ergibt, war es günstig, bei P. denitrificans die ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase mit $NADPH_2$ zu messen. Bei R. gelatinosa war es unter allen Anzuchtsbedingungen günstiger, die ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase mit $NADH_2$ zu untersuchen, da die Aktivität der MDH mit $NADH_2$ um ein Vielfaches höher war als mit $NADPH_2$.

Tab. 13 Anwesenheit der $NAD(P)H_2$-Oxidase und der $NAD(P)H_2$-Malat-Dehydrogenase

Organismen	Spez. Aktivität (E/g Protein) $NADH_2$ Oxidase	$NADPH_2$ Oxidase	MDH ($NADH_2$)	MDH ($NADPH_2$)
Paracoccus denitrificans	58,7	<1,1	14 400	456,0
R. gelatinosa Acetat anaerob	8,1	3,6	++[+)]	306,1
R. gelatinosa Acetat aerob	7,8	3,5	++[+)]	388,0
R. gelatinosa Glycol. anaerob	5,1	<1,1	++[+)]	< 1,6
R. gelatinosa Glycol. aerob	<2,1	5,9	3 794	500

++[+)] sehr hohe Aktivitäten

Testbedingungen für die $NAD(P)H_2$-Oxidase (Testvolumen 1 ml): 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,12 mM $NAD(P)H_2$ und Extrakt. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Testbedingungen für die $NAD(P)H_2$-Malat-Dehydrogenase (Testvolumen 1 ml): wie für oben erwähnte $NAD(P)H_2$-Oxidase. Zusätzlich wurde 0,5 mM Oxalacetat hinzugefügt. Auch diese Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Die Untersuchungen wurden mit den Isomeren des ß-Hydroxyaspartats, dem erythro-ß-Hydroxyaspartat und dem threo-ß-Hydroxyaspartat durchgeführt. Dabei konnten die Ergebnisse von KORNBERG und MORRIS (1962) bestätigt werden, daß P. denitrificans erythro-ß-Hydroxyaspartat mit Hilfe der Dehydratase zu Oxalacetat umsetzt. Die spez. Aktivität betrug 61,6 E/g Protein. Threo-ß-Hydroxyaspartat wurde nicht umgesetzt.

Bei R. gelatinosa konnte die ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase weder mit erythro-ß-Hydroxyaspartat noch mit threo-ß-Hydroxyaspartat nachgewiesen werden.

Die Reaktionsabläufe sind in Abb. 11 wiedergegeben.

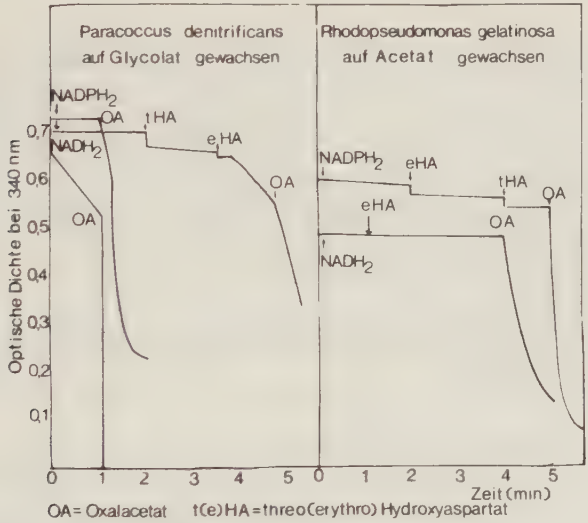


Abb. 11 Aktivität der ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase von Paracoccus denitrificans und R. gelatinosa

Testbedingungen (Testvolumen 1 ml): 10 µMole Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, 0,12 µMol NAD(P)H_2 und Extrakt ad 0,95 ml. An den mit Pfeilen markierten Punkten wurden folgende Substanzen hinzugegeben: OA: 0,5 µMol Oxalacetat; t-HA: 0,5 µMol DL-threo-ß-Hydroxyaspartat; e-HA: 0,2 µMol DL-erythro-ß-Hydroxyaspartat. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Aus diesen Ergebnissen ging klar hervor, daß die ß-Hydroxyaspartat-Aldolase bei R. gelatinosa schon deswegen nicht nachgewiesen werden konnte,

da R. gelatinosa über keine ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase verfügte. Es schien aber nicht sinnvoll, die ß-Hydroxyaspartat-Aldolase nach der Methode von GIBBS und MORRIS (1964) zu untersuchen (mit erythro-DL-ß-Hydroxyaspartat als Substrat), da das Fehlen der ß-Hydroxyaspartat-Dehydratase es nicht wahrscheinlich erscheinen ließ, daß der ß-Hydroxyaspartat-Weg in R. gelatinosa vorhanden war.

Dagegen gab der Nachweis, daß Glyoxylat mit $NADPH_2$ reduziert wurde, später den ersten Hinweis, daß der Serin-Weg an der weiteren Umsetzung des Acetats beteiligt sein könnte. Nach HOLZER und HOLDORF (1957) handelt es sich bei der Glyoxylat-Reduktase und der Hydroxypyruvat-Reduktase - eines der Enzyme des Serin-Wegs - um ein und dasselbe Enzym. Hierüber wird im Kapitel über den Serin-Weg berichtet.

3. Beteiligung einer Transaminierungsreaktion an der weiteren Umsetzung des Glyoxylats

Da weder der ß-Hydroxyaspartat-Weg noch der Glycerat-Weg für die weitere Umsetzung des Glyoxylats in Frage kamen, wurde untersucht, ob das in der Isocitrat-Lyase-Reaktion entstandene Glyoxylat durch eine Transaminierungsreaktion umgesetzt wurde. Dafür kamen in erster Linie die Glyoxylat-Aspartat-Aminotransferase und die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase in Frage.

Mit Hilfe der Glyoxylat-Aspartat-Aminotransferase läuft folgende Reaktion ab:

$$\text{Glyoxylat} + \text{Aspartat} \rightleftharpoons \text{Oxalacetat} + \text{Glycin}$$

Es wurde versucht, das dabei gebildete Oxalacetat nachzuweisen, jedoch ohne Erfolg. Durch die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase wird folgende Reaktion katalysiert:

Glyoxylat + Alanin ⟶ Pyruvat + Glycin

Da sowohl Glyoxylat als auch Pyruvat mit LDH reagieren, war es für den Nachweis des Pyruvats wesentlich, vorher das noch im Test befindliche Glyoxylat abzufangen. Da Tris mit Glyoxylat eine Schiff'sche Base bildet, wurde der Nachweis des Pyruvats in Tris-Puffer durchgeführt.

Die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase konnte in R. gelatinosa nachgewiesen werden, wenn der Organismus anaerob im Licht gewachsen war. Ob diese Enzymreaktion tatsächlich eine der Ersatzreaktionen für die Malat-Synthase darstellte, wurde an Zellen überprüft, die aerob im Dunkeln gewachsen waren. Es war zu erwarten, daß bei diesen Zellen die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase gar nicht oder in nicht so großer Aktivität vorhanden war,da diese Zellen noch über die Malat-Synthase verfügten. Es zeigte sich, daß die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase wirklich in geringerer Aktivität vorlag, wenn die Zellen aerob im Dunkeln gewachsen waren. Die Ergebnisse sind in Tab. 14 zusammengefaßt.

Tab. 14 Nachweis der Transaminase-Reaktionen bei R. gelatinosa

Wachstumsbedingungen	Enzym	Spez. Akt. (E/g Protein)
20 mM Acetat anaerob-hell	Glyoxylat-Aspartat-Aminotransferase	< 0,6
20 mM Acetat anaerob-hell	Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase	225,0
20 mM Acetat aerob-dunkel	Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase	38,8

Testbedingungen für die Glyoxylat-Aspartat-Aminotransferase (Testvolumen 1 ml): 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,1, 0,1 µM Pyridoxalphosphat, 0,15 mM $NADH_2$, 50 µg MDH, 5 µM Na-Glyoxylat, 5 µM L-Aspartat und Extrakt. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase (Testvolumen 2,5 ml): 25 mM Na-Glyoxylat, 25 µM Pyridoxalphosphat, 200 mM Borsäure/200 mM KCl, pH 8,4 (eingestellt mit NaOH), 25 mM Alanin und Extrakt. Die Reaktion wurde mit Alanin gestartet und bei 37° C inkubiert. Nach einer definierten Zeit wurde der Test mit 900 mM TCA abgestoppt. Nachdem das Reaktionsgemisch wieder mit NaOH neutralisiert worden war, wurde 1/10 des Ansatzes auf Pyruvat untersucht. Testansatz zur Pyruvatbestimmung (Testvolumen 3 ml): Probe, 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8, 1 µg LDH und 1 mM $NADH_2$. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Durch diese Untersuchung ergab sich, daß die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase von R. gelatinosa bei aerobem Dunkelwachstum in geringerer Aktivität vorlag als bei anaerobem Lichtwachstum. Diese Beobachtung wurde durch eine Wachstumskurve unterstützt, bei der ein Wechsel der Wachstumsbedingungen von aerob-dunkel nach anaerob-hell vorgenommen wurde. Aus Abb. 12 kann man entnehmen, daß die Aktivität der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase im selben Umfang zunahm, wie die Malat-Synthase abnahm.

Nach diesem Kurvenverlauf war anzunehmen, daß die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase tatsächlich Teil einer Reaktionsfolge war, die funktionell die Malat-Synthase ersetzte.

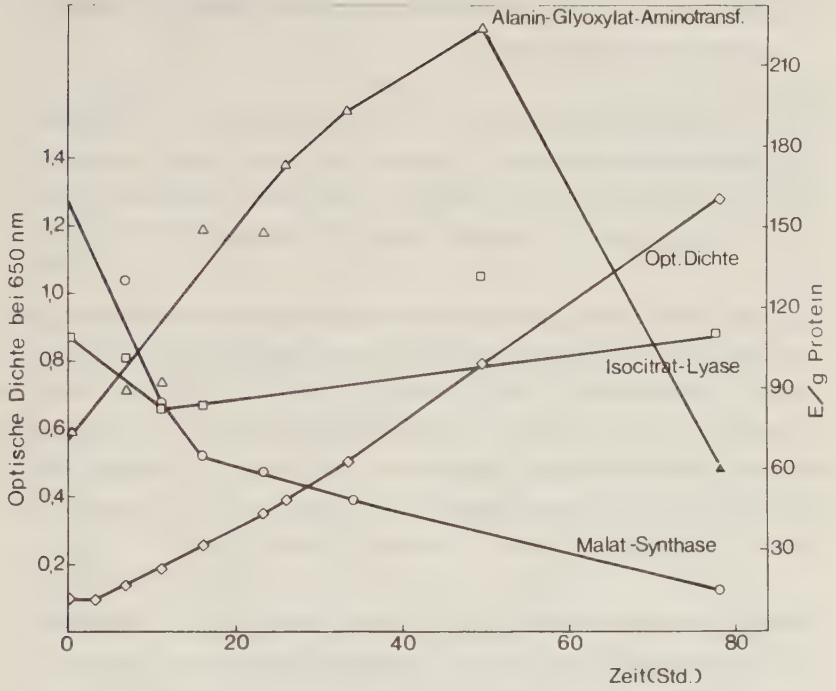


Abb. 12 Veränderung der Aktivität der Malat-Synthase und der Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase beim Wechsel von aerobem Dunkelwachstum zu anaerobem Lichtwachstum

◇= optische Dichte; □= Isocitrat-Lyase; O= Malat-Synthase;
△= Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase

Zum Zeitpunkt 0 wurden 10 l aerob angezogene Zellen (s. "Methoden") in eine 10 l-Jenaer-Glasflasche überführt, eine Probe entnommen und anschließend mit sauerstofffreiem Stickstoff begast, so daß von nun an anaerobe Bedingungen in der Kultur herrschten. Die Kultur wurde mit 2 400 Lux beleuchtet. In den angegebenen Abständen wurde die Kultur auf Trübung, pH, Isocitrat-Lyase-, Malat-Synthase- und Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase-Aktivität untersucht.

4. Beteiligung einer Transaminierungsreaktion am Acetatstoffwechsel in anderen Rhodospirillaceae

Bei R. gelatinosa hatte sich gezeigt, daß die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase in niedrigen Aktivitäten vorhanden war, wenn sowohl Isocitrat-Lyase als auch Malat-Synthase anwesend waren. Hohe Aktivitäten konnten gefunden werden, wenn R. gelatinosa Malat-Synthase fehlte.

In diesem Zusammenhang wurden auch einige andere Rhodospirillaceae untersucht. Nach den Ergebnissen bei R. gelatinosa konnte man erwarten, daß die Organismen mit vollständigem Glyoxylatzyklus nur über geringe Aktivitäten der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase verfügten. Bei ihnen war keine Ersatzreaktion nötig. Es war aber interessant, wie sich die Arten verhielten, die zwar Malat-Synthase, aber keine Isocitrat-Lyase bilden konnten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 wiedergegeben.

Die Untersuchungen bestätigten im allgemeinen das erwartete Ergebnis. Verständlicherweise war bei allen Organismen eine gewisse Aktivität an Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase zu finden, da dieses Enzym sicherlich bei allen Bakterien zusätzlich die Funktion hat, Glycin in ausreichender Menge bereitzustellen.

Der einzige Organismus, der das erwartete Ergebnis nicht bestätigte, war R. sphaeroides. Hierfür eine Erklärung zu geben, ist aber zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich, da nicht geklärt ist, wie R. sphaeroides die Reaktion der Isocitrat-Lyase ersetzt.

Tab. 15 Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase-Aktivität bei verschiedenen Rhodospirillaceae

Organismus	Wachstumsbed.	Spez. Aktivität (E/g Protein) ICL	MS	Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase
Rhodomicrobium vannielii	anaerob-hell	35,9	17,1	14,0
R. palustris	anaerob-hell	29,5	50,3	50,1
"	aerob-dunkel	47,0	49,4	99,2
R. tenue St.3761	anaerob-hell	38,0	14,8	49,8
R. gelatinosa	aerob-dunkel	149,0	149,9	38,8
"	anaerob-hell	84,0	<2,0	225,0
R. sphaeroides	anaerob-hell	<1,2	50,8	436,3
Rsp. rubrum	anaerob-hell	<1,4	66,1	6,8
"	aerob-dunkel	<1,7	42,1	4,9
R. capsulata	anaerob-hell	<2,0	192,1	81,5
R. viridis St. 2750	anaerob-hell	<1,7	8,3	19,6

Die Testbedingungen waren dieselben wie unter Tab. 2 und Tab. 14.

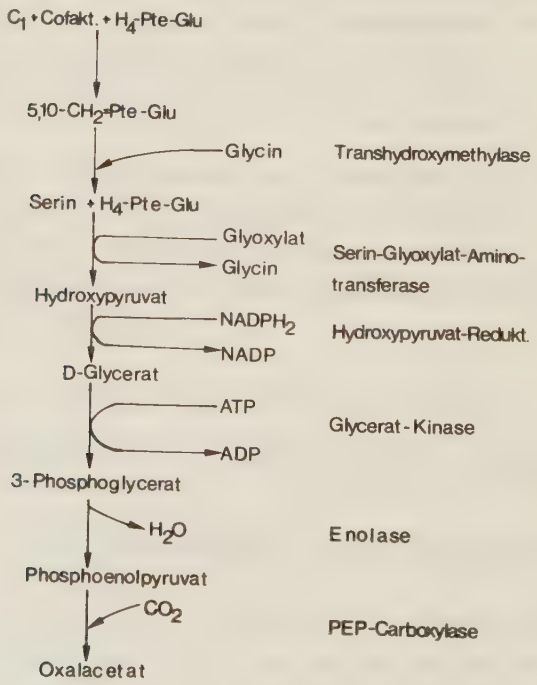
5. Beteiligung des Serin-Wegs an der Umsetzung des Glycins

Durch die Glyoxylat-Alanin-Aminotransferase war aus Glyoxylat Glycin entstanden. Der Teil des Glycins, der nicht direkt für die Purin-Synthese oder zum Aufbau des Bakteriochlorophylls benötigt wurde, mußte durch eine Reaktionsfolge dem "pool" der C_4-Dicarbonsäure zugeführt werden, um eine

ausreichende Biosynthese von Zuckern und anderen Aminosäuren zu gewährleisten.

LARGE et al. (1962) fanden bei Pseudomonas AM 1 einen Biosyntheseweg, bei dem aus C_1-Körpern C_3- und C_4-Körper gebildet wurden. Dieser Biosyntheseweg schloß die Hydroxymethylierung des Glycins zum Serin ein und weiter eine Carboxylierung des C_3-Körpers, der aus dem Serin gebildet war. Hierdurch entstand ein C_4-Körper, wie z. B. Oxalacetat oder Malat.

Dieser Biosyntheseweg, der vom Glycin über Serin zum Phosphoglycerat führte, wurde von HEPTINSTALL und QUAYLE (1970) Serin-Weg benannt; er umfaßt die in Abb. 13 wiedergegebenen Schritte:



Der erste Hinweis, daß diese Reaktionsfolge in R. gelatinosa vertreten ist, war schon durch das Auffinden der $NADPH_2$-spezifischen Glyoxylat-Reduktase gegeben, da die Glyoxylat-Reduktase und die Hydroxypyruvat-Reduktase nach HOLZER und HOLLDORF (1957) identisch sind.

5.1. Nachweis der Serin-Transhydroxymethylase

Das erste Enzym des Serin-Wegs - die Serin-Transhydroxymethylase - wurde nach zwei verschiedenen Methoden nachgewiesen. Der erste Nachweis nach SCRIMGEOUR und HUENNEKENS (1953) beruhte darauf, daß Formaldehyd auf Grund der folgenden Reaktion in Serin eingebaut wird:

$$\text{Formaldehyd + THF} \rightleftharpoons N^5,N^{10}\text{-Methylen-THF + } H_2O$$
$$N^5,N^{10}\text{-Methylen-THF + Glycin + } H_2O \rightleftharpoons \text{THF + L-Serin}$$

$$\text{Formaldehyd + THF + Glycin} \rightleftharpoons \text{THF + L-Serin}$$

Nach der Methode von SCRIMGEOUR und HUENNEKENS (1953) macht man sich diese Abnahme des Formaldehyds zunutze. Man bestimmt mit Acetylaceton die Menge des Formaldehyds am Anfang und am Ende der Reaktion. Anhand einer Eichkurve kann man über die gemessene Extinktion die Menge des nicht umgesetzten Formaldehyds bestimmen.

Nach dieser Methode konnte bei R. gelatinosa keine Serin-Transhydroxymethylase bestimmt werden. Dies war darauf zurückzuführen, daß die Methode wenig empfindlich ist. Diese Feststellung trafen auch schon LARGE und CARTER (1973).

Abb. 13 Reaktionsfolge des Serin-Wegs nach HEPTINSTALL und QUAYLE (1970)

Tab. 16 Abhängigkeit der Serin-Transhydroxymethylase bei R. gelatinosa von der Extraktmenge und der Dauer der Inkubation

Testbedingungen	gebildeter Formaldehyd		mμMole	Spez. Akt. der Serin-Transhydroxymethylase
	cpm/Ansatz	cpm/Ansatz (korrigiert*)	x min	(E/g Protein)
0,04 ml Extrakt	4 860	2 032	1,25	2,43
0,08 ml Extrakt 5'	7 113	4 285	2,63 x=5'	2,57
0,12 ml Extrakt	8 266	5 438	3,34	2,17
0,04 ml Extrakt	6 898	4 070	2,50	2,43
0,08 ml Extrakt 10'	9 650	6 828	4,204 x=10'	2,04
0,12 ml Extrakt	13 078	10 250	6,31	2,04
0,04 ml Extrakt	9 043	6 215	3,82	2,48
0,08 ml Extrakt 15'	12 908	10 080	6,206 x=15'	2,01
0,12 ml Extrakt	17 706	14 873	9,161	1,98
- Extrakt	2 828			

*) Die Spalte cpm/Ansatz (korrigiert) entstand dadurch, daß von allen Ansätzen die cpm abgezogen wurden, die bei dem Testansatz, der ohne Extrakt durchgeführt worden war, gemessen wurden.

Testbedingungen (0,4 ml Gesamtvolumen): 0,1 μMol Serin (= 164 486 cpm), 0,1 μMol Pyridoxalphosphat, 0,104 μMol THF, 4 μMole Mercaptoäthanol, 50 μMole KPO_4-Puffer, pH 7,4 und Enzym (0,1 ml). Dieser Testansatz wird 5, 10 oder 15 min bei 37° C inkubiert und nach der jeweiligen Zeit mit 0,3 mMol Na-Acetat, pH 4,7 abgestoppt. Dazu werden 20 μMole Formaldehyd und 120 μMole Dimedon (in 50 % Äthanol) gegeben. Das Volumen von Na-Acetat-Puffer, dem Formaldehyd und Dimedon, beträgt 0,8 ml. Dieses Testgemisch wird 5 min bei kochendem Wasser erhitzt, um die Bildung von Formaldehyd-Dimedon-Derivaten zu beschleunigen. Nachdem die Röhrchen anschließend 5 min in einem Eisbad abgekühlt worden waren, wurde die Dimedonkomponente aus dem Reaktionsgemisch mit 5 ml Toluol durch Schütteln extrahiert. Das Schütteln wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die dabei entstehenden zwei Phasen wurden durch 2minütiges Zentrifugieren getrennt. 3,0 ml der oberen Phase wurden in 5,0 ml Bray'scher Lösung im Tri-Carb ausgezählt.

Es wurde daher ein radioaktiver Test nach TAYLOR und WEISSBACH (1965) zu Hilfe genommen, der sich als um eine Zehnerpotenz genauer erwies als der vorherige Test. Nach dieser Methode konnte eine Aktivität der Serin-Transhydroxymethylase von 2,0 - 2,5 E/g Protein nachgewiesen werden. Die genauen Daten kann man aus der Tab. 16 ersehen.

Damit war das Eingangsenzym des Serin-Wegs, wenn auch in geringer Aktivität, gefunden.

5.2. Nachweis der Hydroxypyruvat-Reduktase

Auf die Serin-Transhydroxymethylase folgte eine Serin-α-Ketosäure-Aminotransferase. Diese Aminotransferase konnte nur durch die nachfolgende Hydroxypyruvat-Reduktase nachgewiesen werden. Daher wurde die Hydroxypyruvat-Reduktase zuerst untersucht. Sie konnte mit einer Aktivität von 20,7 E/g Protein nachgewiesen werden. Das Enzym ist streng $NADPH_2$-spezifisch. Die Werte sind aus Tab. 17 zu ersehen.

Tab. 17 Aktivität der Hydroxypyruvat-Reduktase in Abhängigkeit von $NADH_2$ und $NADPH_2$

Testbedingungen	Spez. Aktivität (E/g Protein)
$NADPH_2$	20,7
$NADH_2$	< 0,5

Testbedingungen (Testvolumen 1 ml): 4 mM KPO_4-Puffer, pH 6,2, 0,25 mM $NAD(P)H_2$, 10 mM Hydroxypyruvat und Extrakt. Die Extinktionsänderung wurde bei 340 nm verfolgt.

Da von HOLZER und HOLDORF (1957) beschrieben wurde, daß die Hydroxypyruvat-Reduktase mit der Glyoxylat-Reduktase identisch ist, sollte R. ge-

latinosa auch auf die Glyoxylat-Reduktase untersucht werden. Dabei war interessant, ob dieses Enzym $NADH_2$- oder $NADPH_2$-spezifisch war. Außerdem sollte festgestellt werden, ob Hydroxypyruvat schneller umgesetzt wurde als Glyoxylat. Dies wird für die in der Literatur beschriebenen Organismen sehr unterschiedlich angegeben (TOLBERT et al. (1970) und ZELITCH und GOTTO (1962)).

Wie aus Tabelle 18 zu ersehen ist, wurde Glyoxylat von der Glyoxylat-Reduktase umgesetzt. Die Reaktion war ebenfalls strikt $NADPH_2$-spezifisch. Die Umsetzungsrate bei 10 mM Substratkonzentration war für Glyoxylat 1,4 - 2,0fach höher als für Hydroxypyruvat.

Tab. 18 Aktivität der $NADPH_2$-spezifischen Hydroxypyruvat-Reduktase bzw. Glyoxylat-Reduktase bei Umsetzung von Hydroxypyruvat oder Glyoxylat

Substrat	Enzymaktivität (ΔE/min)
10 mM Hydroxypyruvat	0,19
10 mM Glyoxylat	0,28

Die Testbedingungen waren dieselben wie unter Tab. 17; es wurden entweder 10 mM Hydroxypyruvat oder 10 mM Glyoxylat eingesetzt. Die Extinktionsänderung wurde bei 340 nm verfolgt.

Die Tatsache, daß Glyoxylat schneller umgesetzt wurde als Hydroxypyruvat, war für die folgenden Untersuchungen der Serin-2-Ketosäuren-Aminotransferase von großer Bedeutung.

5.3. Nachweis der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase

Die folgenden Aminotransferasen wurden bei R. gelatinosa untersucht:

1. Serin-Oxalacetat-Aminotransferase
2. Serin-α-Ketoglutarat-Aminotransferase
3. Serin-Pyruvat-Aminotransferase
4. Serin-Glyoxylat-Aminotransferase

Der Nachweis der Serin-Oxalacetat-Aminotransferase wurde nach der Methode von CRIPPS und NOBLE (1973) durchgeführt. Hierbei wurde versucht, Aspartat mit Hydroxypyruvat zu Serin und Oxalacetat umzusetzen. Es konnte keine Extinktionsänderung als Folge der Reduktion von Oxalacetat zu Malat beobachtet werden. Diese Aminotransferase schien nicht an der weiteren Umsetzung des Serins beteiligt zu sein. Photometrisch konnte auch kein Nachweis der Serin-α-Ketoglutarat-Aminotransferase erbracht werden.

Die Serin-Pyruvat-Aminotransferase katalysiert folgende Umsetzung:

$$\text{Serin} + \text{Pyruvat} \longrightarrow \text{Hydroxypyruvat} + \text{Alanin}$$

Nachdem die Reaktion nach einer definierten Zeit abgestoppt worden war, wurde versucht, das gebildete Hydroxypyruvat mit Hilfe der Glyoxylat-Reduktase von BOEHRINGER umzusetzen. Es konnte keine Extinktionsänderung beobachtet werden. Auch ein kontinuierlicher Test, der analog zur Serin-Glyoxylat-Aminotransferase durchgeführt wurde, zeigte kein Ansteigen der Extinktion.

Es schien also auch die Serin-Pyruvat-Aminotransferase für die weitere Umsetzung des Serins zum Hydroxypyruvat auszufallen. Der photometrische Nachweis der Serin-Glyoxylat-Aminotransferase erwies sich aus den folgenden Gründen als nicht durchführbar.

Das durch die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase gebildete Hydroxypyruvat sollte nach der Methode von BLACKMORE und QUAYLE (1970) mit Hilfe von $NADPH_2$ und der im Extrakt vorhandenen Glyoxylat-Reduktase = Hydroxypyruvat-Reduktase zu Glycerat umgesetzt werden. Nach der Testvorschrift sollte die anfängliche Blindreaktion, die vor Zugabe des Serins durch die Reduktion des Glyoxylats erfolgte, von der Endreaktion abgezogen werden. Wie schon die Untersuchungen an der Hydroxypyruvat-Reduktase ergeben hatten, war ein solcher Test bei R. gelatinosa nicht durchführbar, da schon bei gleicher Konzentration der Substrate (Glyoxylat und Hydroxypyruvat) das Glyoxylat schneller umgesetzt wurde.

Da die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase photometrisch nicht nachweisbar war, wurde versucht, sie mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zu erfassen.

Es wurden zur Kontrolle noch Testansätze der Serin-α-Ketoglutarat-, der Serin-Pyruvat- und der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase auf ihre Reaktionsprodukte untersucht. Da diese Testansätze bei pH 7,1, also einem mittleren pH, durchgeführt wurden, sollte auch überprüft werden, ob bei diesem pH die Rückreaktion begünstigter war.

Wie in Abb. 14 zu sehen ist, konnte die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase bei R. gelatinosa als das Enzym nachgewiesen werden, das Serin in Hydroxypyruvat umwandelte. Auch durch die Dünnschichtchromatographie bestätigte sich, daß die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase in R. gelatinosa vorhanden war.

Abb. 14 Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Reaktionsprodukte nach Umsetzung der Substrate durch die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase (1 + 2), Serin-Pyruvat-Aminotransferase (3+4), Serin-α-Ketoglutarat-Aminotransferase (5 + 6) und Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase (7)

Die Testansätze wurden, wie unter den "Methoden" beschrieben, durchgeführt und 4 Stunden bei 30° C inkubiert. 6 µl eines jeden Gemisches wurden dann auf eine DC-Platte aufgetragen und die Substanzen durch das Lösungsmittelgemisch n-Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser im Verhältnis 30 : 30 : 6 : 15 aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufs wurde die Laufmittelgrenze markiert, die Platte getrocknet und die Aminosäuren durch Besprühen mit Ninhydrin nachgewiesen.

Testansatz 1: Serin + Glyoxylat → Hydroxypyruvat + Glycin
2: Hydroxypyruvat + Glycin → Serin + Glyoxylat
3: Serin + Pyruvat → Hydroxypyruvat + Alanin
4: Hydroxypyruvat + Alanin → Serin + Pyruvat
5: Serin + α-Ketoglutarat → Hydroxypyruvat + Glutamat
6: Hydroxypyruvat + Glutamat → Serin + α-Ketoglutarat
7: Alanin + Glyoxylat → Pyruvat + Glycin

Die Rf-Werte der gefundenen Aminosäuren stimmten etwa mit denen von STAHL (1967) überein. Durch die Ansätze, sowohl für die Hin- als auch für die Rückreaktion, konnten obendrein die Laufstrecken der bekannten Aminosäuren mit denen der gebildeten verglichen werden. Die Werte sind in Tab. 19 wiedergegeben.

Tab. 19 Rf-Werte für die untersuchten Aminosäuren im Vergleich zu den Literaturwerten von STAHL (1967)

Substanz	ermittelter Rf-Wert d.gebild.Substanz	ermittelter Rf-Wert d.einges.Substanz	Rf-Wert lt.STAHL
Serin	--	52	48
Glycin	29,2	29,2	32
Alanin	36,9	36,9	37
Glutamat	--	18,4	18

Mit diesen Untersuchungen war nachgewiesen, daß die Serin-Glyoxylat-Aminotransferase als einzige der untersuchten Aminotransferasen an der Umsetzung des Serins zum Hydroxypyruvat beteiligt war. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms wurde nicht bestimmt.

5.4. Nachweis der Glycerat-Kinase

Der Nachweis der Glycerat-Kinase erfolgt nach HEPTINSTALL und QUAYLE (1970) in einem gekoppelten Test; die in Abb. 15 wiedergegebenen Reaktionen laufen ab.

Nach dem Originaltestansatz wird außer den Hilfsenzymen Phosphoenolpyruvat in das Reaktionsgemisch gegeben. PEP sollte dann mit dem bei der Bildung von Phosphoglycerat freigesetzten ADP zu Pyruvat umgesetzt wer-

den. Die weitere Umsetzung zu Lactat wurde photometrisch verfolgt.

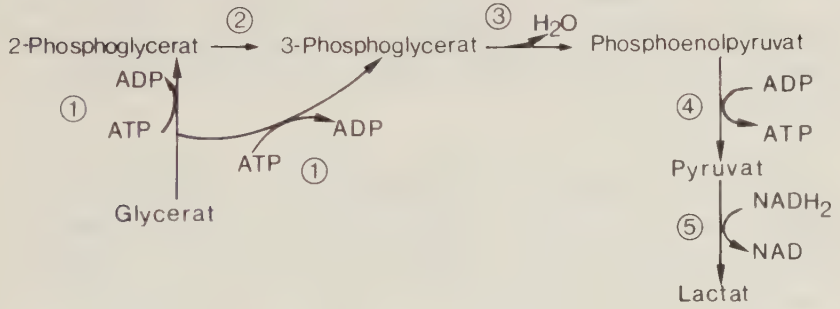


Abb. 15 Reaktionsablauf beim Nachweis der Glycerat-Kinase

1. Glycerat-Kinase; 2. Phosphoglyceromutase; 3. Enolase;
4. Pyruvat-Kinase; 5. Lactat-Dehydrogenase

Testbedingungen (Testvolumen 1 ml): 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,3, 1 mM EDTA, 0,5 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DL-Glycerat, 0,3 mM $NADH_2$, 500 µg Phosphoglyceromutase, 200 µg Enolase, 1 µg Pyruvat-Kinase, 500 µg LDH und Extrakt.

Als der Versuch in der Weise durchgeführt wurde, zeigte sich, daß in R. gelatinosa offensichtlich eine sehr hohe ATPase-Aktivität vorlag. Dadurch war ADP nicht begrenzend, sondern konnte mit dem im Test befindlichen PEP zu Pyruvat und Lactat weiterreagieren. Eine Aussage, ob unter diesen Bedingungen R. gelatinosa eine Glycerat-Kinase vorlag, konnte nach diesem Experiment nicht getroffen werden.

In Abwandlung des Originaltests wurde darauf PEP weggelassen. Trotzdem war es wünschenswert, die ATPase-Aktivität möglichst gering zu halten, damit nicht die Aktivität der Glycerat-Kinase durch zu niedrige Konzentra-

tionen von ATP begrenzt wurde. ABRAMS und BARON (1968) berichteten, daß die ATPase fest an den Membranen gebunden bleibt, wenn der Aufschluß und die weitere Verarbeitung in Anwesenheit von $MgCl_2$ vorgenommen werden. Es wurden daher die Zellen in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$ aufgeschlossen. Nach dem Aufschluß wurde der Extrakt 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nachdem diese Veränderungen am Test vorgenommen worden waren, konnte die Glycerat-Kinase bei R. gelatinosa mit einer spez. Akt. von 15,52 E/g Prot. gemessen werden. Es mußte allerdings darauf geachtet werden, daß die Enzymreaktion eine lag-Phase von 2 - 3 min hatte. Erst dann wies sie eine wesentlich schnellere Reaktionsgeschwindigkeit als die anfänglich gemessene NADH-Oxidase auf. Der Reaktionsablauf wird in Abb. 16 verdeutlicht.

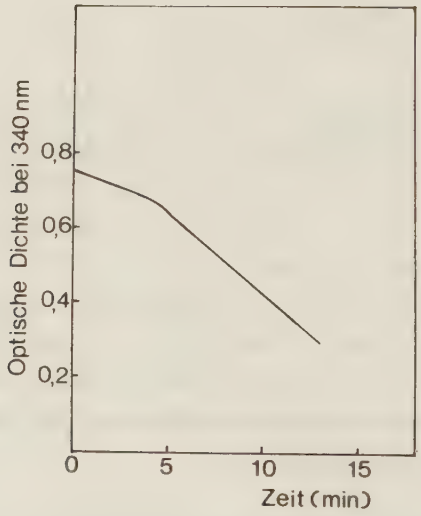


Abb. 16 Reaktionsablauf der Glycerat-Kinase
Testbedingungen wie unter Abb. 15.

Eine Kontrolle, ob die Reaktion auch ohne ATP ablief, konnte leider nicht befriedigend durchgeführt werden, da das Mg^{2+} in Abwesenheit von ATP als Magnesiumhydroxyd ausfiel. Wenn man in Abwesenheit von ATP die Mg^{2+}-Konzentration erniedrigte, gab es keinen Niederschlag. Es konnte auch keine Enzymaktivität gemessen werden. Die Glycerat-Kinase erreichte allerdings auch nach Zugabe von ATP nicht die volle Reaktionsgeschwindigkeit. Auch der Einsatz von 1 mM EDTA bei voller Magnesiumkonzentration verhinderte den Magnesiumhydroxydniederschlag. Es konnte auch keine Aktivität des Enzyms ohne ATP gemessen werden. Wiederum war aber nicht die volle Reaktionsgeschwindigkeit nach Zugabe von ATP nachzuweisen. Weitere Untersuchungen wurden dazu nicht durchgeführt.

Auf Grund dieses Tests kann keine Unterscheidung getroffen werden, ob das Glycerat zu 2- oder 3-Phosphoglycerat umgesetzt wurde.

6. Umsetzung des Serins zum Pyruvat mit Hilfe der Serin-Dehydratase

Eine Alternative zum Serin-Weg ist die Desaminierung des Serins zum Pyruvat (YANOWSKY und REISSIG, 1953; BENZIMAN et al., 1960). Das gebildete Pyruvat kann dann entweder mit Hilfe des "malic enzyme" zu Malat oder über PEP mit Hilfe der PEP-Carboxylase zu Oxalacetat umgewandelt werden.

Die Serin-Dehydratase konnte bei R. gelatinosa nach anaerobem Lichtwachstum mit einer Aktivität von 17,9 E/g Protein nachgewiesen werden.

7. Nachweis der verbindenden Reaktionen zwischen dem Serin-Weg und dem TCC

Durch die Isocitrat-Lyase, Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase und die Reaktionsfolge des Serin-Wegs können 2 Mole Acetat zu 1 Mol 2- oder 3-Phosphoglycerat umgewandelt werden. Das daraus entstehende PEP wurde mit ei-

ner Aktivität von 12,3 E/g Protein zu Oxalacetat carboxyliert. Damit war die Verbindung zum TCC hergestellt.

Das Pyruvat, das z. B. bei der Reaktion der Serin-Dehydratase entstand, konnte nicht direkt mit Hilfe der Pyruvat-Carboxylase zu Oxalacetat carboxyliert werden. Dieses Enzym war bei R. gelatinosa nicht nachzuweisen. Pyruvat mußte erst durch die PEP-Synthase zu PEP umgewandelt werden. Die PEP-Synthase lag bei R. gelatinosa in einer Aktivität von 38,8 E/g Protein vor. Die Ergebnisse sind in Tab. 20 zusammengefaßt.

Tab. 20 Spezifische Aktivität der Pyruvat-Carboxylase, PEP-Carboxylase und PEP-Synthase

Enzym	Spez. Aktivität (E/g Protein)
Pyruvat-Carboxylase	<1,3
PEP-Carboxylase	12,3
PEP-Synthase	38,2

Testbedingungen für die Pyruvat-Carboxylase (Testvolumen 1 ml): 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP (neutralisiert), 15 mM $KHCO_3$, Citrat-Synthase (2 E), 1 mM Acetylphosphat, PTA (5 E), 0,6 mM CoA, 10 mM Na-Pyruvat und Extrakt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30° C inkubiert und mit Pyruvat gestartet. Die Reaktion lief 10, 20 und 30 min. Danach wurde das Reaktionsgemisch abgekocht und anschließend auf Citrat mit Hilfe der Citrat-Lyase untersucht.

Testbedingungen für die Citrat-Lyase (Testvolumen 1 ml): 50 mM TEA-Puffer, pH 7,5, 0,3 mM $NADH_2$, 0,2 mM $MgCl_2$, 10 µg MDH, 40 µg Citrat-Lyase und Probe aus Pyruvat-Carboxylase-Ansatz (Citrat). Die Extinktionsänderung wurde bei 340 nm verfolgt.

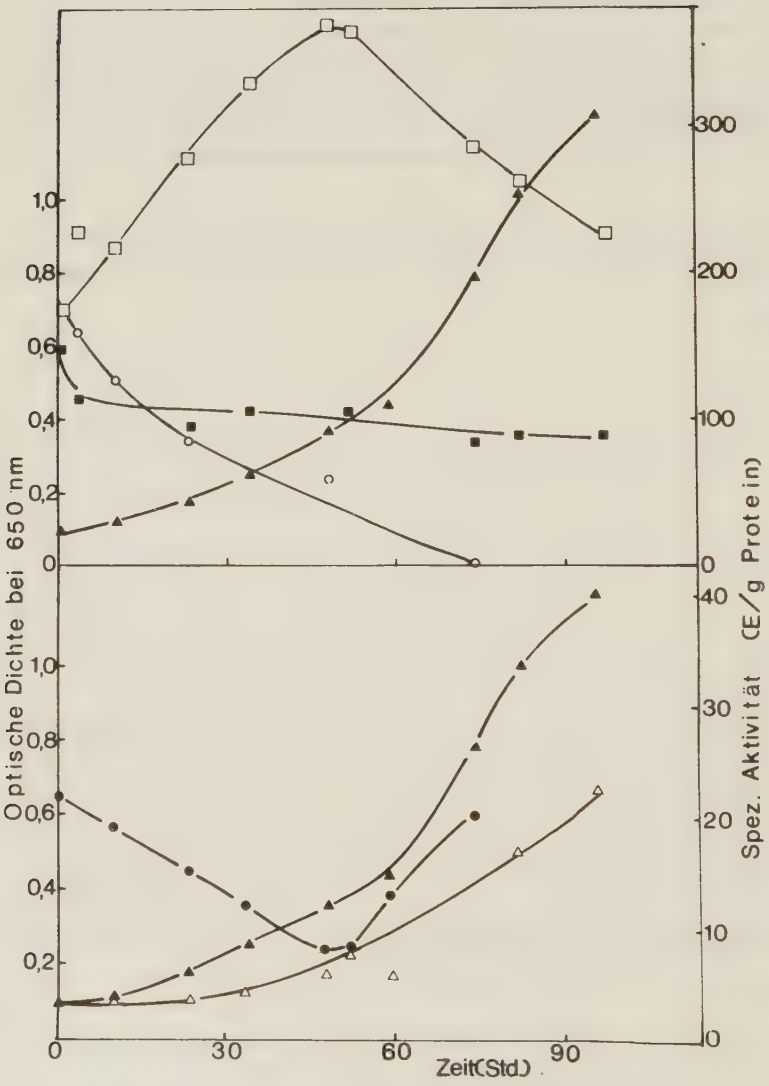
Testbedingungen für die PEP-Carboxylase (Testvolumen 1 ml): 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,2, 0,25 mM $NADH_2$, 10 µg MDH, 50 mM $KHCO_3$, 1 mM $MnCl_2$, 5 mM PEP und Extrakt. Die Extinktionsänderung wurde bei 340 nm verfolgt.

Testbedingungen für die PEP-Synthase (Testvolumen 1 ml): 50 mM Tris-HCl,

pH 8,0, 10 mM $MgSO_4$, 5 mM ATP (neutralisiert), 1,5 mM Pyruvat und Extrakt. Die Reaktion wurde bei 30° C durchgeführt und mit dem Extrakt gestartet. Nach 5, 10 und 15 min wurde jeweils 0,1 ml Probe entnommen und in 0,9 ml H_2O und in 0,1 % 2,4 Dinitrophenylhydrazin gegeben. Dieses Gemisch wurde 10 min bei 30° C inkubiert. Darauf erfolgte die Zugabe von 1,8 ml 10 % NaOH. Nach 10 min wurde bei 436 nm gegen die Kontrolle ohne ATP gemessen. Durch eine Eichkurve mit Dinitrophenylhydrazin und Pyruvat konnte die gemessene Extinktion in gebildete µMole Pyruvat umgerechnet werden.

8. Verhalten der Enzyme des Glyoxylatzyklus, des Serin-Wegs sowie der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase bei Wechsel der Wachstumsbedingungen

Durch einen Wachstumsversuch, bei dem die Zellen zuerst aerob im Dunkeln und dann anaerob im Licht wuchsen, wurden die Aktivitäten der Isocitrat-Lyase, Malat-Synthase, Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase, der Serin-Dehydratase und der Hydroxypyruvat-Reduktase gemessen. Die Hydroxypyruvat-Reduktase wurde stellvertretend für alle Enzyme des Serin-Wegs gemessen. Es sollte festgestellt werden, ob die Aktivität der Serin-Dehydratase und der Enzyme des Serin-Wegs unter den veränderten Wachstumsbedingungen anstiegen, da diese Enzyme als die Ersatzreaktion für die Malat-Synthase angesehen wurden. Es konnte aber nicht unbedingt erwartet werden, daß sich dies in einem Anstieg der Enzymaktivitäten wiederspiegeln würde. Das Eingangsenzym des Serin-Wegs, die Serin-Transhydroxymethylase, lag schon unter anaeroben Bedingungen in so niedriger Aktivität vor, daß es wahrscheinlich als das geschwindigkeitsbestimmende Enzym angesehen werden mußte. Dadurch war zu verstehen, daß die nachfolgenden Enzyme auch schon unter anaeroben Bedingungen keine sehr hohen Aktivitäten aufwiesen.


Optische Dichte bei 650 nm
Spez. Aktivität (E/g Protein)
Zeit(Std)
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
10
20
30
40
60
90
100
200
300

Obwohl die spez. Aktivität der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase bei diesem Versuch in allen Punkten etwa um den Faktor 2 höher lag als bei der Wachstumskurve in Abb. 12, konnte wieder unter anaeroben Wachstumsbedingungen ein Ansteigen der Aktivität beobachtet werden. Wie bei dem vorherigen Wachstumsversuch trat nach 50 Stunden eine Hemmung der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase auf. Die spez. Aktivität ging auf ihren anfänglichen Wert zurück.

Die spez. Aktivität der Serin-Dehydratase und der Hydroxypyruvat-Reduktase schien erst nach 50 Stunden geringfügig zu steigen.

Abb. 17 Veränderung der Malat-Synthase, der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase, der Serin-Dehydratase und der Hydroxypyruvat-Reduktase beim Wechsel vom aeroben Dunkelwachstum zum anaeroben Lichtwachstum

▲ = Opt. Dichte; ■ = Isocitrat-Lyase; ○ = MS; □ = Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase; △ = Serin-Dehydratase; ● = Hydroxypyruvat-Reduktase.

Der Wachstumsversuch wurde, wie unter Abb. 13 beschrieben, durchgeführt. In den angegebenen Abständen wurde die Kultur auf Trübung, ICL, MS, Alanin-Glyoxylat-Aminotransf., Serin-Dehydratase und Hydroxypyruvat-Reduktase untersucht.

9. Versuche zum Nachweis einer Pyruvat-Synthase

Das Acetat kann in R. gelatinosa mit Hilfe der Isocitrat-Lyase, der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase, des Serin-Wegs und PEP-Carboxylase zu C_4-Dicarbonsäuren umgewandelt werden. Das schloß natürlich nicht aus, daß zusätzliche andere Reaktionen eine Rolle spielten. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen war beispielsweise eine Pyruvatbildung durch reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA denkbar:

$$\text{Acetylphosphat} + CO_2 + FdH_2 \longrightarrow \text{Pyruvat} + Fd$$

Diese Reaktion dient den Clostridien normalerweise zur Oxydation des Pyruvats zu Acetyl-CoA; es sind aber auch Fälle bekannt geworden, in denen sie als Pyruvat-Synthase fungiert (BUCHANAN et al., 1964, 1967; BACHOFEN et al., 1964; ANDREW und MORRIS, 1965). Charakteristisch für die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase ist, daß sie eine Pyruvat-CO_2-Austauschreaktion katalysiert (WILSON et al., 1948). Letztere läßt sich einfach nachweisen und dient als Indiz für das Vorhandensein dieses Enzymsystems.

Es wurden Versuche an zellfreien Extrakten von R. gelatinosa vorgenommen. Als Vergleich wurde das Enzym bei C. kluyveri untersucht, da von diesem Organismus bekannt war, daß er über die Pyruvat-CO_2-Austauschreaktion verfügt. Die gefundenen Werte sind in Tabelle 21 zusammengefaßt.

Tab. 21 Pyruvat-CO_2-Austausch-Reaktion in Extrakten von C. kluyveri und R. gelatinosa

Organismus Testbedingungen	cpm/Ansatz	gebild. Pyruvat cpm/Ansatz	Spez. Akt. (E/g Prot.)
C. kluyveri			
0,25 ml Extr.	300 640	18 460	2,6
0,5 ml Extr.	300 640	33 460	2,33
0,25 ml Extr.; -Pyruvat	300 640	308	0,04
0,25 ml Extr.; -CoA	300 640	20 144	2,88
R. gelatinosa			
0,4 ml Extr.	300 640	5 812	0,72
0,8 ml Extr.	300 640	13 280	0,83
1,2 ml Extr.	300 640	17 332	0,72
0,4 ml Extr.; -CoA	300 640	3 952	0,5
0,8 ml Extr.; -CoA	300 640	9 888	0,61
1,2 ml Extr.; -CoA	300 640	18 840	0,78
0,4 ml Extr.; -CoA -Pyruvat	300 640	1 532	0,20

Testbedingungen (Testvolumen 2 ml): 50 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2, 25 mM Mercaptoäthanol, 50 mM Na-Pyruvat, 1 mM $MnSO_4$, 0,5 mM TPP, 0,025 mM CoA, 50 µg Avidin, 5 mM $KHCO_3$, $Na_2{}^{14}CO_3$ (30 064/µMol) und Extrakt. Das Reaktionsgemisch wurde bei C. kluyveri 30 min, bei R. gelatinosa 60 min bei 30° C inkubiert und dann mit 0,2 ml 20 % Perchlorsäure abgestoppt. Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand 10 min begast, um die flüchtigen radioaktiven Substanzen zu entfernen. Ein Aliquot des Reaktionsgemisches wurde im Tri-Carb ausgezählt.

Aus Tab. 21 kann man entnehmen, daß die Pyruvat-CO_2-Austauschreaktion bei C. kluyveri vertreten war. Die spez. Aktivität der Pyruvat-CO_2-Austauschreaktion bei R. gelatinosa nach anaerobem Lichtwachstum auf Acetat betrug 0,7 E/g Prot.

Wegen dieser geringen Aktivität wurde ein weiterer Test durchgeführt. Es wurde versucht, die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase durch die Reduktion von Methylviologen als Elektronenacceptor deutlich zu machen.

Auch dieses Experiment gab keinen Hinweis auf das Enzym. Es muß nach diesen Ergebnissen die Frage gestellt werden, ob eine Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase in R. gelatinosa vorhanden ist.

IV. Erste Untersuchungen zum Abbau des Acetats bei Rhodospirillum rubrum

Rsp. rubrum verfügt weder bei anaerobem Lichtwachstum noch bei aerobem Dunkelwachstum über einen vollständigen Glyoxylatzyklus. Bei diesem Organismus konnte nach der Methode von DIXON und KORNBERG (1959) keine Isocitrat-Lyase nachgewiesen werden. Da sich während der Reaktion Phenylhydrazin im Test befindet, sollte untersucht werden, ob Phenylhydrazin das Enzym hemmt und es daher nicht nachweisbar war.

Es wurde deswegen versucht, die Isocitrat-Lyase nach einem anderen Testprinzip nachzuweisen. Das bei der Isocitrat-Lyase-Reaktion entstehende Glyoxylat sollte mit LDH und NAD(P)H_2 umgesetzt werden. Für diese Reaktion mußte allerdings sichergestellt sein, daß das dabei entstehende NAD(P) nicht mit dem noch im Test befindlichen Isocitrat zu α-Ketoglutarat reagieren konnte. Es wurde also untersucht, ob die Isocitrat-Dehydrogenase in Rsp. rubrum NAD- oder NADP-spezifisch war. Wie aus Abb. 18 zu ersehen ist, handelte es sich um ein NADP-spezifisches Enzym.

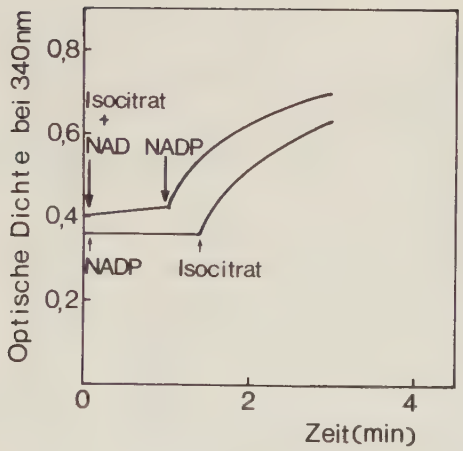


Abb. 18 Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase von Rsp. rubrum mit NAD und NADP

Testbedingungen (Testvolumen 3 ml): 66 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM Cystein-HCl, 0,1 mM NAD(P), 3,3 mM Isocitrat und Extrakt. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Da die Isocitrat-Dehydrogenase in Rsp. rubrum mit NAD kaum Aktivität aufwies, war es günstig, das aus Isocitrat entstehende Glyoxylat mit $NADH_2$ und LDH zu reduzieren. In Abbildung 19 ist zu erkennen, daß unter diesen Testbedingungen keine Bildung von Glyoxylat erfolgte. Wurde aber zu dem Testgemisch Glyoxylat hinzugefügt, erfolgte eine Abnahme der Extinktion - ein Beweis, daß eventuell gebildetes Glyoxylat sichtbar geworden wäre.

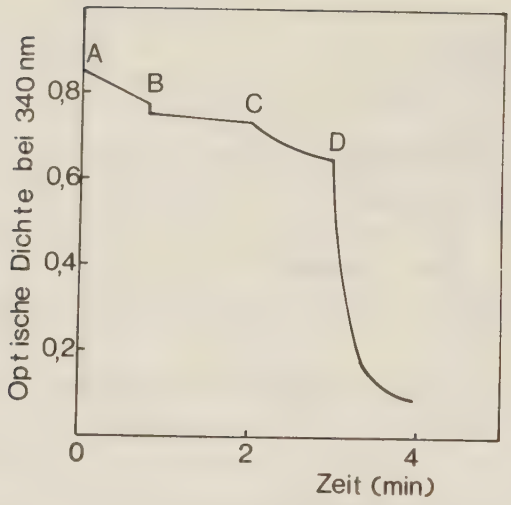


Abb. 19 Versuch zum Nachweis der Isocitrat-Lyase in Rsp. rubrum

A = Extrakt; B = Isocitrat; C = 0,033 mM Glyoxylat; D = 0,33 mM Glyoxylat

Testbedingungen (Testvolumen 3 ml): 66 mM KPO_4-Puffer, pH 7,2, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM Cystein-HCl, 10 µg LDH, 0,1 mM $NADH_2$ und Extrakt. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt.

Eine weitere Methode, die Isocitrat-Lyase in Rsp. rubrum zu messen, war eine veränderte Methode von DIXON und KORNBERG (1959). Hierbei wurde das Phenylhydrazin erst 2 min nachdem die Reaktion getestet worden war in das Reaktionsgemisch gegeben. Das bis zu diesem Zeitpunkt gebildete Glyoxylat sollte sofort mit dem Phenylhydrazin zum Phenylhydrazon reagieren. Auf diese Weise sollte wiederum vermieden werden, daß Phenylhydrazin das Enzym hemmt. Auch unter diesen Testbedingungen konnte keine Isocitrat-Lyase nachgewiesen werden.

Es wurde daher nach einer anderen Reaktion gesucht, bei der Glyoxylat ent-

stehen kann.

PORTER und MERRETT (1970) hatten beschrieben, daß Rsp. rubrum Glyoxylat durch eine Aldolspaltung aus α-Hydroxyglutarat bilden kann. Bei keinem der unternommenen Versuche konnte je eine Bildung von Glyoxylat festgestellt werden. Das eventuell dabei entstandene Glyoxylat konnte weder mit Dinitrophenylhydrazin noch mit Glyoxylat-Reduktase erfaßt werden. Da die Inkubationszeit zum Teil über eine Stunde betrug, wurde eine Kontrolle durchgeführt, ob Glyoxylat über diesen Zeitraum stabil war. Es war keine Abnahme des eingesetzten Glyoxylats nach einer Stunde zu beobachten. Daraus wurde geschlossen, daß die Spaltung von α-Hydroxyglutarat nicht an der Bildung von Glyoxylat in Rsp. rubrum beteiligt war. Damit bleibt ungeklärt, wie in Rsp. rubrum Glyoxylat als Substrat für die Malat-Synthase zur Verfügung gestellt wird.

D. DISKUSSION

1. Malyl-CoA-Lyase und Enzyme des Glyoxylatzyklus

Bei Wachstum auf Acetat ist bei vielen Mikroorganismen der Glyoxylatzyklus als anaplerotische Sequenz notwendig (KORNBERG und MADSEN, 1957; 1958; KORNBERG und KREBS, 1957). Dieser Zyklus kommt auch in pflanzlichen, aber nicht in tierischen Zellen vor (WEGENER et al., 1968). Die Regulation des Zyklus ist bei den Organismen unterschiedlich. Nach KORNBERG (1970) wird die Synthese der beiden Schlüsselenzyme des Zyklus, Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, bei E. coli als ein Operon koordiniert reguliert. HARDER et al. (1973) stellten fest, daß bei der Übertragung von Hyphomicrobium Stamm X von einem Äthanolmedium auf ein Methanolmedium die Malat-Synthase verschwand, die Isocitrat-Lyase aber weiterhin vorhanden war. Wachstum auf Methanol war auch in Abwesenheit der Malat-Synthase möglich. Offensichtlich wurden hier die beiden Enzyme nicht koordiniert reguliert.

Mit den Ergebnissen von HARDER et al. (1973) stimmten die Ergebnisse, die in dieser Arbeit für R. gelatinosa erzielt wurden, überein. Auch in diesem Organismus mußte die Synthese für die Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase unabhängig voneinander reguliert sein, wie an der Abnahme der Malat-Synthase unter anaeroben Bedingungen im Licht zu erkennen war.

ROSENBERGER (1962) beobachtete, daß die Synthese der Isocitrat-Lyase bei Achromobacter Stamm D 15 bei Wachstum auf Succinat durch Zugabe von Acetat induziert werden konnte. Eine solche Induktion konnte für R. gelatinosa nach Abb. 6 wohl ausgeschlossen werden, da die Acetatkonzentration während der gesamten Zeit des Versuchs annähernd konstant blieb. Die Isocitrat-Lyase-Aktivität erhöhte sich jeweils nach dem Verbrauch eines Substrats.

Die Feinregulierung des Zyklus erfolgt bei E. coli durch Endprodukt-Hemmung der Isocitrat-Lyase. Der Inhibitor ist Pyruvat oder PEP. Inwieweit dies auch für R. gelatinosa zutrifft, wurde nicht weiter untersucht. In diesem Zusammenhang sollte aber den Ergebnissen von GIFFHORN (1974) Beachtung geschenkt werden. Er konnte nachweisen, daß die Citrat-Lyase-Desacetylase in R. gelatinosa durch Glutamat gehemmt wird. Da mit Citrat wachsende Zellen eine aktive Citrat-Lyase besitzen, ist anzunehmen, daß unter diesen Bedingungen die Glutamatkonzentration in den Zellen für eine Hemmung der Desacetylase hinreichend hoch ist (GIFFHORN, 1974). Die Citrat-gewachsenen Zellen von R. gelatinosa weisen aber auch eine niedrige Isocitrat-Lyase-Aktivität auf, sodaß eine Regulation dieses Enzyms durch Glutamat nicht auszuschließen ist.

Bei den Untersuchungen an den verschiedenen Rhodospirillaceae war auffallend, daß viele der Organismen weder unter anaeroben Bedingungen im Licht, noch unter aeroben Bedingungen im Dunkeln (soweit dann ein Wachstum möglich war) über Isocitrat-Lyase verfügten. In diesen Organismen war nur Malat-Synthase nachzuweisen. Folglich mußte ein anderes Enzymsystem vorhanden sein, das die Isocitrat-Lyase in ihrer anaplerotischen Funktion ersetzte.

Die von PORTER und MERRETT (1970) bei Rsp. rubrum beschriebene Spaltung von α-Hydroxyglutarat in Glyoxylat und Propionat konnte nicht bestätigt werden, sodaß weiterhin unbekannt bleibt, woher diese Organismen das Glyoxylat erhalten.

Da nur in den Vertretern der Rhodospirillaceae, die keine Isocitrat-Lyase besitzen, Malyl-CoA-Lyase nachgewiesen werden konnte, besteht natürlich die Möglichkeit, daß dieses Enzym in einem funktionellen Zusammenhang mit dem unvollständigen Glyoxylatzyklus steht.

Eine Spaltung von Malyl-CoA war erstmals von TUBOI und KIKUCHI (1962,

1965) in R. sphaeroides beschrieben worden. Das dafür verantwortliche Enzym, die Malyl-CoA-Lyase, wurde in jüngster Zeit in Hyphomicrobium Stamm X, Pseudomonas AM1, Pseudomonas Stamm Shaw MA, Pseudomonas MS, Methylococcus capsulatus und Methylosinus trichosporium nachgewiesen. Alle diese Organismen können auf C_1-Verbindungen wie Methanol, Formiat oder Methylamin wachsen (HERSH und BELLION, 1972; SALEM et al., 1973; HERSH, 1973).

Während des Wachstums auf C_1-Verbindungen ist es die Funktion der Malyl-CoA-Lyase, Glyoxylat für den Serin-Weg zu regenerieren und Acetyl-CoA für anabolische Reaktionen zu liefern (HARDER et al., 1973). Von einigen Autoren ist auch schon vermutet worden, daß die Malyl-CoA-Lyase unspezifisch sei und auch mit anderen Verbindungen reagiert. Das Enzym wird in Bezug auf L-Malat kompetitiv gehemmt durch Succinat, DL-Isocitrat, D-Malat und Glutarat. L-Malat kann nicht durch D-Malat, DL-Hydroxyglutarat, DL-Citramalat oder Mesotartrat ersetzt werden. Diese Ergebnisse wurden an Pseudomonas Stamm MA erzielt. Die Aktivierung der untersuchten Substanzen erfolgte durch die Malat-Thiokinase, die, im Gegensatz zu Pseudomonas AM1,in diesem Organismus nachgewiesen werden konnte (HERSH und BELLION, 1972; BELLION und HERSH, 1972).

Inwieweit die Malyl-CoA-Lyase-Reaktion bei den Rhodospirillaceae spezifisch für L-Malyl-CoA ist, wurde noch nicht untersucht. Es ist also zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht auszuschließen, daß die Malyl-CoA-Lyase eine größere Affinität zu einem anderen Substrat als Malyl-CoA hat. Das Auffinden eines solchen Substrats könnte einen neuen Ansatzpunkt für das Verständnis des Stoffwechsels der Bakterien liefern, die nicht über Isocitrat-Lyase,aber über Malat-Synthase und Malyl-CoA-Lyase verfügen.

2. Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase ist in vielen Clostridien vertreten und wurde von MORTENSON et al. (1962) beschrieben. In dieser Reaktion wird Acetyl-CoA gebildet und der außerdem anfallende Wasserstoff auf Ferredoxin übertragen. Die oxydierte Form des Ferredoxins wird entweder über eine Hydrogenase durch Wasserstoff-Entwicklung oder durch Ferredoxin-Pyridinnukleotid-Reduktasen regeneriert. Durch die Funktion der Ferredoxin-Pyridinnukleotid-Reduktasen können Pyridinnukleotide durch molekularen Wasserstoff reduziert werden. Diese Eigenschaften macht es insbesondere saccharolytischen Clostridien möglich, auf Pyruvat zu wachsen.

Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase-Reaktion ist reversibel. Die Pyruvat-Synthase-Reaktion katalysiert die Bildung von Pyruvat aus Acetyl-CoA, reduziertem Ferredoxin und CO_2. Eine wesentliche Rolle spielt diese Reaktion z. B. in C. kluyveri bei Wachstum auf Acetat und Äthanol (ANDREW und MORRIS, 1965). Außerdem ist die Pyruvat-Synthase in Rsp. rubrum und Chlorobium thiosulfatophilum beschrieben worden. Nach dem Auffinden dieses Enzyms postulierten BUCHANAN et al. (1964) den reduktiven Tricarbonsäurezyklus in diesen beiden Organismen.

In R. gelatinosa konnte die Pyruvat-Synthase nur mit einer Aktivität von 0,7 E/g Protein nachgewiesen werden. Nach den Angaben von EVANS et al. (1966) betrug die Aktivität der Pyruvat-Synthase in Rsp. rubrum 0,5 E/g Protein und in Chlorobium thiosulfatophilum 3,3 E/g Protein. Es ist also fraglich, ob dieses Enzym in diesen Organismen tatsächlich eine Bedeutung hat. Daß ein reduktiver TCC weder in Rsp. rubrum, noch in Chlorobium thiosulfatophilum existieren kann, konnte BEUSCHER (1972) nachweisen, indem er feststellte, daß keiner der beiden Organismen über Citrat-Lyase verfügt. Das Vorhandensein von Citrat-Lyase, α-Ketoglutarat-Synthase und Pyruvat-Synthase ist jedoch die Voraussetzung für das Funktionieren

eines reduktiven Tricarbonsäurezyklus.

R. gelatinosa verfügt im Gegensatz zu den vorhergenannten Organismen über Citrat-Lyase (SCHAAB et al., 1972). Es ist allerdings nicht bekannt, inwieweit Ferredoxin in diesem Organismus vorhanden ist. Ohne die Anwesenheit von Ferredoxin oder eines ähnlichen Faktors ist das Ablaufen der Pyruvat-Synthase-Reaktion nicht möglich. Es ist bis jetzt nur ein Non Heme Iron Sulfur Protein in R. gelatinosa beschrieben worden, das sich von Ferredoxin dadurch unterscheidet, daß es nicht autoxydabel ist und ein hohes positives Redoxpotential von +0,33 V besitzt (KLERK und KAMEN, 1966; DUS et al., 1967). Es wurde deshalb auch als "High Potential Iron Protein"(HiPiP) bezeichnet. Ein ähnliches HiPiP wurde auch bei Chromatium beschrieben (BARTSCH, 1963). Hierbei beträgt das Potential +0,35 V. Schon BARTSCH (1963) bezweifelte, daß dieses Non Heme Iron Protein auf Grund seiner vollkommen anderen Potentialverhältnisse die Funktion von Ferredoxin übernehmen kann.

Die niedrige spezifische Aktivität und das Fehlen eines Ferredoxin-ähnlichen Faktors machen es unwahrscheinlich, daß eine reduktive Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Pyruvat in R. gelatinosa ablaufen kann.

3. Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase

Bei R. gelatinosa wurde unter anaeroben Bedingungen im Licht eine wesentlich höhere Enzymaktivität der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase gefunden, als wenn der Organismus aerob im Dunkeln gewachsen war. Dies Enzym schien Teil einer Ersatzreaktion für die fehlende Malat-Synthase zu sein, wie aus Abb. 12 und Abb. 17 zu ersehen ist.

Daß Aminotransferasen das Fehlen eines Enzyms ausgleichen können, wurde auch schon von HATCH und MAU (1973) beschrieben. Die Autoren berichten, daß C_4-Pflanzen, die in diesem Fall über wenig malic enzyme ver-

fügten, hohe Aktivitäten an Aminotransferasen aufwiesen. Außerdem konnten sie beobachten, daß im Licht gewachsene Pflanzen eine viel höhere Aminotransferase-Aktivität besaßen als im Dunkeln gewachsene. Wenn aber im Dunkeln gewachsene Pflanzen dem Licht ausgesetzt wurden, zeigten sie nach 48 Stunden dieselbe Enzymaktivität wie die Pflanzen, die von vornherein im Licht gewachsen waren.

4. Serin-Weg

Der in R. gelatinosa nachgewiesene Serin-Weg wurde zuerst von LARGE und QUAYLE (1963) beschrieben. Der Serin-Weg ist neben dem Ribulose-5-phosphat-Weg derjenige Biosynthese-Weg, über den C_1-Körper assimiliert werden können.

Daß der Serin-Weg auch bei Wachstum auf Acetat auftritt, ist, soweit dies bekannt ist, nicht beschrieben. Bekannt sind geringe Aktivitäten der Enzyme des Serin-Wegs nach Wachstum auf C_2-Körpern wie Äthanol und Nitriloacetat (HARDER et al., 1973; CRIPPS und NOBLE, 1973). Bei den meisten Organismen besteht bei Wachstum auf einem C_2-Körper kein Bedarf für den Serin-Weg, da das bei ihnen entstehende Glycin für die Purin-Synthese benötigt wird und nicht wieder dem Intermediärstoffwechsel zugeführt werden muß. Die Begründung, daß R. gelatinosa auch bei Wachstum auf Acetat über die Enzyme des Serin-Wegs verfügt, liegt wahrscheinlich darin, daß bei diesem Organismus die fehlende Malat-Synthase nach anaerobem Lichtwachstum durch die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase ersetzt wird. Der Anteil des Glycins, der nicht für die Purin- oder Porphyrin-Synthese benötigt wird, kann über den Serin-Weg dem Intermediärstoffwechsel zugeführt werden.

Die gefundenen Enzymaktivitäten sind besonders für die Serin-Transhydroxymethylase relativ gering. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß die Aktivität des Enzyms mit Tetrahydropteroylmonoglutamat bestimmt wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, daß das Coenzym mit 1 - 7 Glutamat-Resten verbunden sein kann. Die Untersuchungen mit Triglutamat-Derivaten durch HIMES und RABINOWITZ (1962) und LARGE und QUAYLE (1963) ergaben, daß diese Triglutamat-Form eine wesentlich höhere Affinität zum Substrat haben kann. Sie stellten darüber hinaus fest, daß das Tetrahydropteroyl-monoglutamat sogar Tetrahydropteroyltriglutamat hemmen kann. Da aber nur die Monoglutamat-Form als Tetrahydrofolsäure leicht chemisch zu synthetisieren ist, wurden bis jetzt die Versuche nur mit der Monoglutamat-Form durchgeführt.

5. Beurteilung der Versuche, die unter Veränderung der Wachstumsbedingungen durchgeführt wurden

Der Versuch, in dem R. gelatinosa erst unter aeroben Bedingungen im Dunkeln und dann unter anaeroben Bedingungen im Licht wuchs, zeigte einen Anstieg der Aktivität der Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase und einen Abfall der Aktivität der Malat-Synthase. Es fiel allerdings auf, daß die Aktivität der Aminotransferase nach 50 Std. wieder abnahm. Erst zu diesem Zeitpunkt begann die Aktivität der Hydroxypyruvat-Reduktase und der Serin-Dehydratase zu steigen.

Eine mögliche Erklärung für diese Kurvenverläufe besteht darin, daß Glycin eventuell diejenige Substanz ist, die sowohl die Enzyme des Serin-Wegs als auch die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase reguliert. Wenn z. B. eine sehr hohe Konzentration an Glycin notwendig wäre, um die Enzyme des Serin-Wegs zu induzieren, wäre dadurch verständlich, daß die Aktivität erst nach einem gewissen Zeitraum (50 Std.) zu steigen beginnt. Wenn diese Konzentration aber bereits hemmend auf die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase wirkt, würde dies das Absinken der Enzymaktivität zu diesem Zeitpunkt zur Folge haben. Es würde danach das anfänglich überschüssig produzierte Glycin von den Enzymen des Serin-Weg umgesetzt werden. Diese Erklärung muß selbstverständlich als Hypothese angesehen werden.

Da während des Wachstums auch der pH-Wert stark ansteigt, ist nicht auszuschließen, daß der hohe pH für das Abfallen der Aminotransferase verantwortlich sein könnte.

In Abb. 20 sind die Reaktionen wiedergegeben, die an der Umsetzung des Acetats in R. gelatinosa unter anaeroben Bedingungen im Licht beteiligt sind.

Diese Reaktionsfolge stellt eine Möglichkeit dar, in der das Acetat in R. gelatinosa unter anaeroben Bedingungen im Licht umgesetzt werden kann.

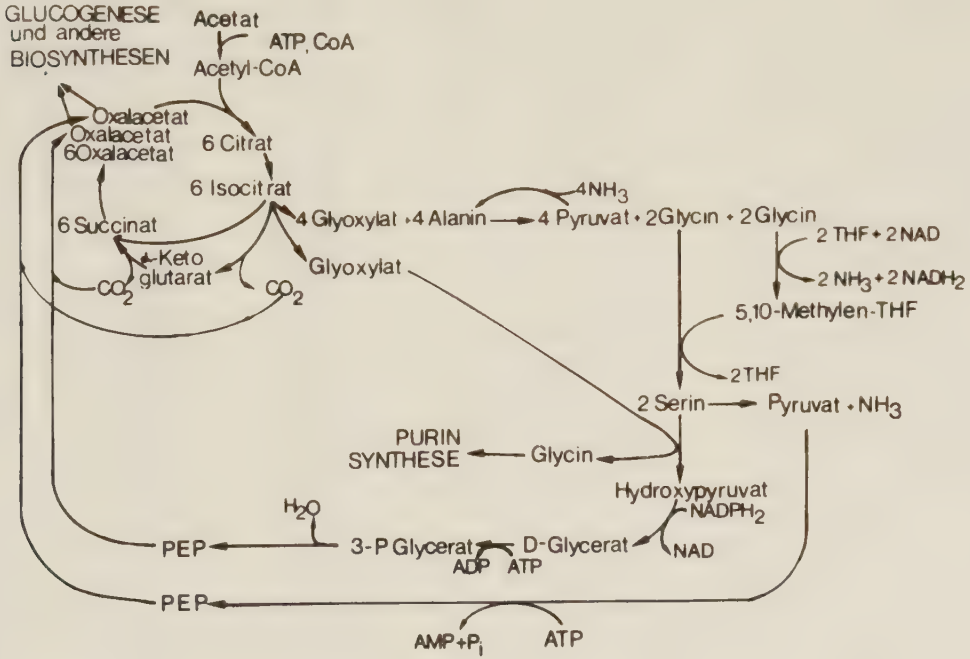


Abb. 20 Die Umsetzung des Acetats in R. gelatinosa nach anaerobem Wachstum im Licht

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Rhodopseudomonas gelatinosa besitzt während des Wachstums auf Acetat unter anaeroben Bedingungen im Licht Isocitrat-Lyase, jedoch keine Malat-Synthase.

   Unter aeroben Bedingungen im Dunkeln sind aber beide Enzyme des Glyoxylatzyklus vorhanden.

2. Als Ersatzreaktion für die Malat-Synthase konnten die Alanin-Glyoxylat-Aminotransferase und die Reaktionsfolge des Serin-Wegs nachgewiesen werden.

3. Der ß-Hydroxyaspartat-Weg und der Glycerat-Weg sind nicht an der weiteren Umsetzung des Glyoxylats beteiligt.

4. Die untersuchten Rhodospirillaceae lassen sich in Bezug auf das Vorhandensein eines vollständigen Glyoxylatzyklus in 3 Gruppen einteilen:

   a) Arten, die sowohl über die Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase verfügen (Rhodomicrobium vannielii , Rhodopseudomonas palustris, Rhodopseudomonas tenue und R. gelatinosa nach aerobem Dunkelwachstum)

   b) Arten, die Malat-Synthase besitzen, aber keine Isocitrat-Lyase (Rhodopseudomonas sphaeroides, Rhodospirillum rubrum, Rhodospirillum fulvum, Rhodospirillum molischianum und Rhodopseudomonas viridis)

   c) Arten, in denen Isocitrat-Lyase nachweisbar ist, denen aber die Malat-Synthase fehlt (R. gelatinosa nach anaerobem Lichtwachstum).

5. In den Rhodospirillaceae, die nur über Malat-Synthase verfügen, konnte Malyl-CoA-Lyase nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieses Enzyms für diese Organismen ist noch nicht geklärt.

F. LITERATURVERZEICHNIS

ABRAMS, A.
BARON, C.
1968
Reversible attachment of adenosine triphosphate to Streptococcus membranes and the effect of magnesium ions.
Biochemistry 7, 501 - 507

ANDREESEN, J. R.
EL GHAZZAWI, E.
GOTTSCHALK, G.
1974
The effect of ferrous ions, tungstate, and selenite on the level of formate dehydrogenase in Clostridium formicoaceticum and formate synthesis from CO_2 during pyruvate fermentation.
Arch. Microbiol. 96, 103 - 118

ANDREW, I. G.
MORRIS, J. G.
1965
The biosynthesis of alanine by Clostridium kluyveri.
Biochim. Biophys. Acta 97, 176 - 179

BACHOFEN, R.
BUCHANAN, R. B.
ARNON, D. I.
1964
Ferredoxin as a reductant in pyruvate synthesis by a bacterial extract.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 690 - 694

BARTSCH, R. G.
1963
Nonheme iron proteins and Chromatium iron protein.
In: H. Gest, A. San Pietro and L. Vernon. Bacterial Photosynthesis, Antioch Press, Yellow Springs, pp. 315 - 326

BEISENHERZ, G.
BOLZE, G.
BÜCHER, T.
CZOK, R.
GARBADE, H. K.
MEYER-AHRENT, E.
PFLEIDERER, E.
1953
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch. 8b, 555 - 557

BELLION, E.
HERSH, L. B.
1972
Methylamine metabolism in a Pseudomonas species.
Arch. Biochem. Biophys. 153, 368 - 374

BENZIMAN, M. SAGERS, R. B. GUNSALUS, I. C.	1960	L-Serine specific dehydrase from Clostridium acidi-urici. J. Bacteriol. 79, 474 - 479
BEUSCHER, N. GOTTSCHALK, G.	1972	Lack of citrate lyase - the key enzyme of the reductive carboxylic acid cycle - in Chlorobium thiosulfatophilum and Rhodospirillum rubrum. Z. Naturforsch. 27b, 968 - 973
BIEBL, H.	1967	Untersuchungen zum Formenkreis und zur Verbreitung der organotrophen Purpurbakterien. Diplomarbeit, Freiburg
BLACKMORE, M. A. QUAYLE, J. R.	1970	Microbial growth on oxalate by a route not involving glyoxylate carboligase. Biochem. J. 118, 53 - 59
BOEHRINGER Information	1971	Enzymatische Analyse für die Lebensmittelchemie. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica
BRAY, G. A.	1960	A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. Analyt. Biochem. 1, 279 - 285
BUCHANAN, B. B. LOVENBERG, W. RABINOWITZ, J. C.	1963	A comparison of clostridial ferredoxins. Proc. Nat. Acad Soc. 49, 345 - 352
BUCHANAN, B. B. BACHOFEN, R. ARNON, D. I.	1964	Role of ferredoxin in the reductive assimilation of CO_2 and acetate by extracts of the photosynthetic bacterium Chromatium. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 839 - 847
BUCHANAN, B. B. EVANS, M. C. W. ARNON, D. I.	1967	Ferredoxin-dependent carbon assimilation in Rhodospirillum rubrum. Arch. Mikrobiol. 59, 32 - 40

COLLIER, H. B.	1973	A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate. Analyt. Biochem. 56, 310 - 311
COOPER, R. A. KORNBERG, H. L.	1969	Phosphoenolpyruvate synthethase. In: Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Vol. XIII, 309 - 314. Academic Press, New York
COX, R. B. ZATMAN, L. J.	1973	Isocitrate lyase and adenosine tri - phosphate malate lyase as key enzymes for the methylotrophic growth of Bacterium 5 H 2. Biochem. Society Transaction 1, 669 - 671
CRIPPS, R. E. NOBLE, A. S.	1973	The metabolism of nitriloacetate by a pseudomonad. Biochem. J. 136, 1059 - 1068
DAGLEY, S.	1969	Citrate lyase. In: Methods of Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Vol. XIII, 160 - 170. Academic Press, New York
DIFCO MANUAL	1953	Difco Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures, pp. 201 - 202, Difco Laboratories, Detroit
DIXON, G. H. KORNBERG, H. L.	1959	Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle. Biochem. J. 72, 3P
DUS, K. KLERK, H. D. E. SLETTEN, K. BARTSCH, R. G.	1967	Chemical characterization of high potential iron proteins from Chromatium and Rhodopseudomonas gelatinosa. Biochim. Biophys. Acta 140, 291 - 311

EGGERER, H.
GRÜNEWÄLDER, C. 1964 Synthese von Malyl-Coenzym A und seiner Diastereomeren.
Justus Liebigs Ann. d. Chemie 677, 200 - 208

EISENBERG, M. A. 1953 The tricarboxylic acid cycle in Rhodospirillum rubrum.
J. Biol. Chem. 203, 815 - 836

ELSDEN, S. R.
ORMEROD, J. B. 1956 The effect of monofluoracetate on the metabolism of Rhodospirillum rubrum.
Biochem. J. 63, 691 - 701

EVANS, M. C. W.
BUCHANAN, B. B. 1965 Photoreduction of ferredoxin and its use in carbondioxide by a subcellular system from a photosynthetic bacterium.
Proc. Nat. Acad. Soc. USA 53, 1420 - 1425

EVANS, M. C. W.
BUCHANAN, B. B.
ARNON, D. I. 1966 A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 928 - 934

FALMAGNE, P.
VANDERWINKEL, E.
WIAME, J. M 1965 Mise en evidence des deux malate synthases chez Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 99, 246 - 258

FALMAGNE, P.
WIAME, J. M. 1973 Purification et charactérisation partielle des deux malate synthases d' Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 37, 415 - 424

GIBBS, R. G.
MORRIS, J. G. 1964 Assay and properties of ß-hydroxyaspartate aldolase from Micrococcus denitrificans.
Biochim. Biophys. Acta 85, 501 - 503

GIBBS, R. G.
MORRIS, J. G. 1970 Glycine-glyoxylate metabolism: ß-Hydroxyaspartate pathway.
In: Methods of Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Vol. XVII A, 981 - 992. Academic Press, New York

GIFFHORN, F.
BEUSCHER, N.
GOTTSCHALK, G.
1972
Regulation of citrate lyase activity in Rhodopseudomonas gelatinosa. Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 467 - 472

GIFFHORN, F.
1974
Regulation der Citrat-Lyase durch chemische Modifikation: Anreicherung und Charakterisierung eines inaktivierenden Enzyms. Dissertation, Göttingen

GLOVER, J.
KAMEN, M. D.
VANGENDEREN, H.
1952
Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria. XII. Comparative light and dark metabolism of acetate and carbohydrate by Rhodospirillum rubrum. Arch. Biochem. Biophys. 35, 384 - 408

GOTTSCHALK, G.
DITTBRENNER, S.
LENZ, H.
EGGERER, H.
1972
Studies on the re-citrate synthase reaction. Eur. J. Biochem. 26, 455 - 461

HARDER, W.
ATTWOOD, M. M.
QUAYLE, J. R.
1973
Methanol assimilation by Hyphomicrobium sp. J. Gen. Microbiol. 78, 155 - 163

HATCH, M. D.
MAU, S. L.
1973
Activity, location, and role of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in leaves with C_4 pathway. Arch. Biochem. Biophys. 156, 195 - 206

HENNING, H. V.
SEUBERT, W.
1964
Zum Mechanismus der Gluconeogenese und ihre Steuerung. I. Quantitative Bestimmung der Pyruvat-Carboxylase in Rohextrakten der Rattenleber. Biochem. Z. 340, 160 - 170

HEPTINSTALL, J.
QUAYLE, J. R.
1970
Pathways leading to and from serine during growth of Pseudomonas AM1 on C_1-compounds or succinate. Biochem. J. 117, 563 - 572

HERSH, L. B. BELLION, E.	1972	Malate cleavage reaction in Pseudomonas species (Shaw strain MA). Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 712 - 719
HERSH, L. B.	1973	Malate adenosine triphosphate lyase. Separation of the reaction into malate thiokinase and malyl-CoA lyase. J. Biol. Chem. 248, 7295 - 7303
HERSH, L. B.	1974	Malyl coenzyme A lyase. Mechanism of action is deduced by kinetic studies. J. Biol. Chem. 249, 5208 - 5212
HIMES, R. H. RABINOWITZ, J. C.	1962	Formyltetrahydrofolate synthetase. II. Characteristics of the enzyme and the enzymic reaction. J. Biol. Chem. 237, 2903 - 2914
HOHORST, H. J.	1970	L(-)Malat. Bestimmung mit Malat-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer, Herausgeber), S. 1544 - 1548, Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstr.
HOLZ, G. BERGMEYER, H. H.	1970	Acetat. Bestimmung mit Acetat-Kinase und Hydroxylamin. In: Methoden der enzymatischen Analyse (H. U. Bergmeyer, Herausgeber), S. 1486 - 1490, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.
HOLZER, H. HOLLDORF, A.	1957	Isolierung von D-Glycerat-Dehydrogenase, einige Eigenschaften des Enzyms und seine Verwendung zur enzymatisch optischen Bestimmung von Hydroxypyruvat neben Pyruvat. Biochem. Z. 329, 292 - 312
JAENICKE, L.	1961	Die Folsäure im Stoffwechsel der Einkohlenstoff-Einheiten. Angew. Chemie 73, 449 - 460
JONES, K. M. GUEST, J. R. WOODS, D. D.	1961	Folic acid and the synthesis of methionine by extracts of Escherichia coli. Biochem. J. 79, 566 - 574

KALTWASSER, H. 1968 Harnsäureabbau und Biosynthese der Enzyme Uricase, Glyoxylatcarboligase und Urease bei Hydrogenomonas H 16. Habilitationsschrift, Göttingen

KLEMME, J. H. 1968 Untersuchungen zur Photoautotrophie mit molekularem Wasserstoff bei neuisolierten schwefelfreien Purpurbakterien. Arch. Mikrobiol. 64, 29 - 42

KLEMME, J. H. 1973 Allosterische Kontrolle der Pyruvat-Kinase aus Rhodospirillum rubrum durch anorganisches Phosphat und Zuckerphosphatester. Arch. Mikrobiol. 90, 305 - 322

KLERK, H. D. E. KAMEN, M. D. 1966 A high potential non-haem iron protein from the facultative photoheterotrophe Rhodopseudomonas gelatinosa. Biochim. Biophys. Acta 112, 175 - 178

KOEPSELL, H. J. JOHNSON, M. J. MEEK, J. S. 1944 Role of phosphate in pyruvate dissimilation by cell-free extracts of Clostridium butylicum. J. Biol. Chem. 154, 535 - 547

KOHLHAW, G. LEARY, T. R. UMBARGER, H. E. 1969 α-Isopropylmalate synthase from Salmonella typhimurium. Purification and properties. J. Biol. Chem. 244, 2218 - 2225

KORNBERG, H. L. KREBS, H. A. 1957 Synthesis of cell-constituents from C_2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. Nature 179, 988 - 991

KORNBERG, H. L. MADSEN, N. B. 1957 Synthesis of C_4-dicarboxylic acids from acetate by a"glyoxylate bypass" of the tricarboxylic acid cycle. Biochim. Biophys. Acta 24, 651 - 653

KORNBERG, H. L.
MADSEN, N. B.
1958
The metabolism of C_2-compounds by microorganisms. 3. Synthesis of malate from acetate via the glyoxylate cycle.
Biochem. J. 68,549 - 557

KORNBERG, H. L.
GOTTO, A. M.
1959
Formation of malate from glycolate by Pseudomonas ovalis Chester.
Nature 183, 1791 - 1793

KORNBERG, H. L.
LASCELLES, J.
1960
The formation of isocitritase by the Athiorhodaceae.
J. Gen. Microbiol. 23, 511 - 517

KORNBERG, H. L.
MORRIS, J. G.
1962
Enzymic formation of oxaloacetate from erythro-ß-hydroxyaspartate.
Biochim. Biophys. Acta 65, 537 - 540

KORNBERG, H. L.
1966
The role and control of the glyoxylate cycle in Escherichia coli.
Biochem. J. 99, 1 - 11

KORNBERG, H. L.
1970
Mechanism of carbohydrate synthesis from C_2- and C_3-acids.
In: Miami Winter Symposium, Vol. I, pp. 103 - 121. Amsterdam: North-Holland Publishing Co.

KRAKOW, G.
BARKULIS, S. S.
1956
Conversion of glyoxylate to hydroxypyruvate by extracts of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 21, 593 - 594

KRAKOW, G.
BARKULIS, S. S.
HAYASHI, J. A.
1961
Glyoxylic acid carboligase: an enzyme present in glycolate grown Escherichia coli.
J. Bacteriol. 81, 509 - 518

LARGE, P. J.
PEEL, D.
QUAYLE, J. R.
1962
Microbial growth on C_1-compounds. 3. Distribution of radioactivity in metabolites of methanol-grown Pseudomonas AM1 after incubation with ^{14}C-methanol and ^{14}C-bicarbonate.
Biochem. J. 82, 483 - 488

LARGE, P. J.
CARTER, R. H. 1973 Specific activities of enzymes of the pathway of carbon assimilation in Pseudomonas omnivorans and Pseudomonas MS grown on methylamine. Biochem. Soc. Transactions 1, 1291 - 1393

LIPMAN, F.
TUTTLE, L. C. 1945 A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. J. Biol. Chem. 159, 21 - 28

MORTENSON, L. E.
VALENTINE, R. C.
CARNAHAN, J. E. 1962 An electron transport factor from Clostridium pasteurianum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 448 - 452

NASH, T. 1953 Colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantz'sche reaction. Biochem. J. 55, 416 - 421

NIEL, C. B. Van 1944 Culture, general physiology, morphology, and classification of the nonsulfur purple and brown bacteria. Bacteriol. Rev. 8, 1 - 118

OLSON, J. A. 1954 The isocitric lyase system: the formation of glyoxylic and succinic acids from isocitric acid. Nature 174, 695 - 696

PFENNIG, N.
LIPPERT, K. D. 1966 Über das Vitamin B_{12}-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch. Mikrobiol. 55, 228 - 266

PFENNIG, N. 1969 Rhodopseudomonas acidophila sp. n. a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. J. Bacteriol. 99, 597 - 602

PORTER, J.
MERRETT, M. J. 1970 Formation of glyoxylate from α-hydroxyglutarate by Rhodospirillum rubrum. FEBS Letters 7, 271 - 273

RABINOWITZ, J. C. PRICER, W. W. Jr.	1957	An enzymatic method of the determi-national formic acid. J. Biol. Chem. 229, 321 - 328
RICHARDSON, K. E. THOMPSON, J. S.	1970	L-Alanine glyoxylate aminotransfe-rase. In: Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Vol. XVII A, 163 - 166. Aca-demic Press, New York
ROSENBERGER, R. F.	1962	An induction-like effect of acetate on the synthesis of isocitrate lyase. Biochim. Biophys. Acta 64, 168 - 170
SALEM, A. R. HACKING, A. J. QUAYLE, J. R.	1973	Cleavage of malyl-CoA into acetyl-CoA and glyoxylate by Pseudomonas AM1 and other C_1-unit utilizing bac-teria. Biochem. J. 136, 89 - 96
SALEM, A. R. HACKING, A. J. QUAYLE, J. R.	1974	Lack of malyl-CoA lyase in a mutant of Pseudomonas AM1. J. Gen. Microbiol. 81, 525 - 527
SAZ, H. J. HILLARY, E. P.	1956	The formation of glyoxylate and suc-cinate from tricarboxylic acids by Pseudomonas aeruginosa. Biochem. J. 62, 563 - 569
SCHAAB, C.	1971	Die Verwertung von Citrat durch Rhodopseudomonas gelatinosa. Diplomarbeit, Göttingen
SCHAAB, C. GIFFHORN, F. SCHOBERTH, S. PFENNIG, N. GOTTSCHALK, G.	1972	Phototrophic growth of Rhodopseudo-monas gelatinosa on citrate: accumu-lation and subsequent utilization of cleavage products. Z. Naturforsch. 27b, 962 - 973
SCRIMGEOUR, K. G. HUENNEKENS, F. M.	1953	Serine Hydroxymethylase. In: Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Vol. V, 838 - 843. Academic Press, New York
SIMON, E. J. SHEMIN, D.	1953	The preparation of s-succinyl-CoA. J. Amer. Chem. Soc. 75, 2520

SMITH, R. A.
GUNSALUS, I. C. 1954 Isocitritase: a new tricarboxylic acid cleavage system.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 5002 - 5003

SMITH, R. A.
GUNSALUS, I. C. 1955 Distribution and formation of isocitritase.
Nature 175, 774 - 775

SMITH, R. A.
GUNSALUS, I. C. 1957 Isocitritase: enzyme properties and reaction equilibrium.
J. Biol. Chem. 229, 305 - 319

SRERE, P. A.
BRAZIL, H.
GONEN, L. 1963 The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscles.
Acta Chem. Scand. 17, 129 - 134

STADTMAN, E. R. 1955 Phosphotransacetylase from Clostridium kluyveri. In: Methods in Enzymology (S. P. Colowick and N. O. Kaplan, eds.), Vol. I, 596 - 599.
Academic Press, New York

STAHL, E. 1967 Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

STERN, J. R. 1963 Enzymic activation and cleavage of D- and L-malate.
Biochim. Biophys. Acta 69, 435 - 437

STOKES, J. E. 1970 The assimilation of organic compounds by the nonsulfur photosynthetic bacteria.
Dissertation, Universität Texas in Austin

TAYLOR, R. T.
WEISSBACH, H. 1965 Radioactive assay for serine transhydroxymethylase.
Analyt. Biochem. 13, 80 - 84

THOMPSON, J. S.
RICHARDSON, K. E. 1968 Determination of pyruvate in enzyme catalyzed reactions in the presence of glyoxylate.
Analyt. Biochem. 24, 197 - 201

TOLBERT, N. E.
YAMAZAKI, R. K.
OESER, A.
1970
Localization and properties of hydroxypyruvate and glyoxylate reductases in spinach leaf particles.
J. Biol. Chem. 245, 5129 - 5136

TOMLINSON, N.
1954a
Carbon dioxide and acetate utilization by Clostridium kluyveri. II. Synthesis of amino acids.
J. Biol. Chem. 209, 597 - 600

TOMLINSON, N.
1954b
Carbon dioxide and acetate utilization in Clostridium kluyveri. III. A new pathway of glutamic acid synthesis.
J. Biol. Chem. 209, 605 - 609

TUBOI, S.
KIKUCHI, G.
1962
Enzymic cleavage of malate to glyoxylate and acetyl-CoA.
Biochim. Biophys. Acta 62, 188 - 190

TUBOI, S.
KIKUCHI, G.
1965
Enzymic cleavage of malyl-coenzyme A into acetyl-coenzyme A and glyoxylic acid.
Biochim. Biophys. Acta 96, 148 - 153

WEGENER, W. S.
REEVES, H. C.
RABIN, R.
AJL, S. J.
1968
Alternate pathways of metabolism of short chain fatty acids.
Bacteriol. Rev. 32, 1 - 26

UMBREIT, W. E.
BURRIS, R.
STAUFFER, J.
1964
Manometric techniques.
Minneapolis, Minn. Burgess Publ. Co.

WEGENER, W. S.
VANDERWINKEL, E.
REEVES, H. C.
AJL, S. J.
1969
Propionate matabolism. V. The physiological significance of isocitrate lyase during growth of E. coli on propionate.
Arch. Biochem. Biophys. 129, 545 - 553

WERTLIES, D.
VISHNIAC, W.
1967
Methane utilization by a strain of Rhodopseudomonas gelatinosa.
J. Bacteriol. 93, 1722 - 1724

WILSON, J.
KRAMPITZ, L. O.
WERKMAN, C. H.
1948
Reversibility of a phosphoroclastic reaction.
Biochem. J. 42, 598 - 600

WONG, D. T. O.
AJL, S. J.
1956
Conversion of acetate and glyoxylate to malate.
J. Amer. Chem. Soc. 78, 3230 - 3231

YANOFSKY, C.
REISSIG, J. L.
1953
L-Serine dehydratase of Neurospora.
J. Biol. Chem. 202, 567 - 577

ZELITCH, I.
GOTTO, A. M.
1962
Properties of a new glyoxylate reductase from leaves.
Biochem. J. 84, 541 - 546

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk für die Anregung zu diesem Thema und die stets gewährte Unterstützung danken.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. N. Pfennig für viele Ratschläge zur Beurteilung der verschiedenen phototrophen Bakterien danken.

Sehr herzlich möchte ich auch Herrn Dr. J. R. Andreesen für die vielen anregenden und hilfreichen Gespräche danken.

LEBENSLAUF

31. 3. 1947	geboren in Göttingen
Frühjahr 1953 bis Frühjahr 1957	Besuch der Grundschule in Bremen
Frühjahr 1957 bis Februar 1966	Besuch der Ricarda-Huch-Schule in Hannover
Februar 1966	Abitur
April 1966	Immatrikulation an der Georg-August-Universität in Göttingen
WS 1967/1968	Zwischenprüfung in Chemie
SS 1968	Zwischenprüfung in Botanik und Zoologie
Oktober 1970	Mündliche Hauptdiplomprüfung mit Mikrobiologie als Hauptfach und physiologischer Chemie und Zoologie als Nebenfächer
Dezember 1971	Abschluß der Diplomarbeit mit dem Titel: "Stereospezifität der Citrat-Synthase in neu isolierten Stämmen von Clostridium kluyveri"
Januar 1972	Beginn der experimentellen Arbeit zu vorliegenden Dissertation.